

**Efeitos da exposição por sete dias ao acetato de  
chumbo sobre a reatividade vascular em anéis de  
aorta de ratos**

**Jonaina Fiorim Pereira**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas  
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo**  
Vitória, fevereiro de 2011

# **Efeitos da exposição por sete dias ao acetato de chumbo sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos**

**Jonaina Fiorim Pereira**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 23/02/2011 por:

---

Prof Dr Dalton Valentim Vassallo – Orientador, UFES

---

Profª Drª Ana Paula Couto Davel, UNICAMP

---

Prof Drª Alessandra Simão Padilha, UFES

---

Prof Dr Leonardo dos Santos, UFES

---

Coordenador do PPGCF: Prof. Dr. Luiz Carlos  
Schenberg

**Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Fevereiro de 2011

**Fiorim, Jonaina 1981**

**Efeitos da exposição por sete dias ao acetato de chumbo sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos [Vitória] 2011**

215p., 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2011)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo

1. Chumbo 2. Reatividade Vascular 3. Óxido Nítrico 4. Canais para K<sup>+</sup> 5. Sistema Renina-Angiotensina 6. Espécies Reativas de Oxigênio.

Aos que eu mais amo, àqueles a quem eu devo tudo o que eu sou e tudo o que eu acredito. Meus pais (José e Waldete), irmãos (Ni e Rafa) e ao meu companheiro (Marcelo).

“Conhecer não é demonstrar nem explicar, é saber aceder à visão”.

Antonie de Saint-Exupéry

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por providenciar todas minhas necessidades e iluminar meu o caminho.

Ao Prof. Dr. Dalton, além de ser um grande Mestre da Ciência é um exímio conhecedor do ser humano, e tem a capacidade de transmitir destreza para potencializar as habilidades dos seus orientandos. “Chefe”, obrigada pela oportunidade de conhecer o mundo da pesquisa e por compartilhar comigo seu extenso conhecimento.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita pela amizade, convívio e disponibilidade em ensinar.

Aos professores do PPGCF pelos conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do LEMC: Alessandra, Aurélia, Bianca, Bruna, Camila, Carolina, Cristina, David, Edna, Eduardo, Fabiana, Fernanda, Gilson, Jhuli Keli, Juliana, Karina, Larissa, Lorena, Maylla, Maria Tereza, Priscila, Rogério, Sâmia e Taís.

À Edna por providenciar meu contato com o LEMC, pelos conselhos, e principalmente, por ter-me dado este projeto.

À Alessandra por sua dedicação e por sua paciência. Obrigada por sempre me acolher nos momentos de dúvidas e me direcionar com boas idéias.

Ao Rogério por suas “boas idéias” e disponibilidade em todos os momentos que procurei sua ajuda, principalmente nos dados bioquímicos.

À minha amiga Ludimila, por sua generosidade. Obrigada por sempre me incentivar.

As minhas amigas: Bruna e Maylla, obrigada pela solidariedade e pelos ótimos momentos compartilhados.

Aos colegas matriculados no programa em 2009: Bruna, Flávia, Leonardo, Ludmila, Maylla, Rebeca e Tiago. Obrigada por compartilhar com vocês os momentos de aflições e de alegrias nas disciplinas.

Ao meu pai José e minha mãe Waldete que são minha referência de vida. Obrigada por abdicarem de seus sonhos em função de minhas necessidades. Amo vocês!

Aos meus irmãos Ni e Rafa. Obrigada pelo amor, paciência, presença e pelos muitos momentos de alegria. É maravilhoso tê-los em minha vida!

Ao Marcelo, que suporta minha ausência e se alegra com minhas conquistas com um indescritível amor gratuito e espontâneo. Obrigada por estar todos os dias ao meu lado!

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>35</b>
1.1	CHUMBO	35
1.1.1.	História do Chumbo	35
1.1.2.	Características do metal	36
1.1.3.	Fontes Naturais do chumbo	37
1.1.4.	Fontes Antropogênicas	37
1.1.4.1	Produção e Consumo Mundial	37
1.1.4.2	Uso industrial	38
1.1.4.3	Formas de exposição do chumbo	41
1.1.5	Cinética do Chumbo no Organismo Humano	43
1.1.6	Efeito do Chumbo nos diferentes sistemas	46
1.1.7	Efeito do Chumbo no Sistema Cardiovascular	48
1.2	HIPERTENSÃO ARTERIAL	52
1.3	MÚSCULO LISO VASCULAR	54
1.4	ENDOTÉLIO VASCULAR	55
1.4.1	Fatores Relaxantes derivados do Endotélio	56
1.4.1.1	Óxido Nítrico	56
1.4.1.2	Prostaciclina	61
1.4.1.3	Fator Hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)	61
1.4.2.	Fatores contráteis derivado do endotélio	64
1.4.2.1	Prostaglandinas vasoconstrictoras	64
1.4.2.2	Endotelina	65
1.4.2.3	Sistema Renina Angiotensina	66
1.4.2.4	Espécies reativas de Oxigênio (EROS)	70



1.5 JUSTIFICATIVA.....	75
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>76</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	76
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	76
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>77</b>
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	77
<b>3.1.1 Modelo Experimental .....</b>	<b>77</b>
3.1.2.1 Concentração sanguínea do chumbo .....	78
3.2 ANÁLISE DA MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.....	78
3.3. METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA.....	78
<b>3.3.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl) .....</b>	<b>80</b>
<b>3.3.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio .....</b>	<b>81</b>
3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	82
<b>3.4.1 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina .....</b>	<b>82</b>
<b>3.4.2 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina .....</b>	<b>82</b>
<b>3.4.3 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na resposta de relaxamento dependente do endotélio.....</b>	<b>82</b>
<b>3.4.4 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na resposta de relaxamento independente do endotélio.....</b>	<b>83</b>
<b>3.4.5 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta à fenilefrina na aorta.....</b>	<b>83</b>

3.4.5.1 Influência do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na via do óxido nítrico.....	84
3.4.5.2 Influência do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na isoforma induzível de óxido nítrico (iNOS).....	84
3.4.5.3 Influência do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre os canais para K <sup>+</sup> .....	85
3.4.5.4 Envolvimento da Angiotensina II local sobre o tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica .....	85
3.4.5.5 Envolvimento de radicais livres no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica	85
3.4.5.6 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre o tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica .....	86
3.5 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTÉICA.....	86
<b>3.5.1 Western Blot para detecção da eNOS, p-eNOS, iNOS , e receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> em aorta de ratos .....</b>	<b>86</b>
<b>3.5.2 Preparação do tecido e quantificação das proteínas.....</b>	<b>87</b>
<b>3.5.3 Eletroforese e transferência das amostras .....</b>	<b>87</b>
<b>3.5.4 Incubação com Anticorpos .....</b>	<b>88</b>
<b>3.5.5 Detecção das Proteínas.....</b>	<b>88</b>
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) PLASMÁTICA .....	89
3.7 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) “IN SITU”. .....	89

<b>3.7.1 Quimioluminescência dependente de lucigenina (QL<sub>Luc</sub>).....</b>	<b>89</b>
<b>3.7.2 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE).....</b>	<b>90</b>
3.8 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	91
3.9 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS .....	92
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>95</b>
4.1. CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO NO SANGUE .....	95
4.2 VALORES DE MASSA CORPORAL .....	95
4.3. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS).....	96
4.4. ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) PLASMÁTICA.....	96
<b>4.4.1 Correlação entre a atividade plasmática da enzima conversora da         angiotensina (ECA) e a pressão arterial sistólica (PAS).....</b>	<b>97</b>
4.5 RESPOSTAS VASCULARES AO CLORETO DE POTÁSSIO (KCl) EM ARTÉRIA AORTA.....	98
4.6 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS. ....	99
4.7 MODULAÇÃO ENDOTELIAL DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS. ....	101
4.8 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA. ....	104

4.9 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA. ....	105
4.10 EFEITO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	106
<b>4.10.1 Participação da via do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica. ....</b>	<b>107</b>
4.10.1.1 Expressão Protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) em aorta de ratos.....	109
4.10.1.2 Razão da expressão Protéica da isoforma fosforilada endotelial da sintase do óxido nítrico (p-eNOS) em relação isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) em aorta de ratos.....	110
<b>4.10.2 Participação da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica. ....</b>	<b>111</b>
4.10.2.1 Expressão Protéica da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) em aorta de ratos.....	112
<b>4.10.3 Participação dos canais para K<sup>+</sup> no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica. ....</b>	<b>113</b>
<b>4.10.4 Participação da Angiotensina II local no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica. ....</b>	<b>116</b>

4.10.4.1 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a enzima conversora da angiotensina (ECA) .....	116
4.10.4.2 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT <sub>1</sub> .....	118
4.10.4.2.1 Expressão Protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT <sub>1</sub> em aorta de ratos .....	119
4.10.4.3. Expressão Protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT <sub>2</sub> em aorta de ratos .....	120
<b>4.10.5 Participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica. ....</b>	<b>121</b>
4.10.5.1 Influência da administração de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica. ....	121
4.10.5.2 Influência da administração da superóxido dismutase (SOD), um “varredor” do ânion superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica. ....	123
4.10.5.3 Influência da administração da Catalase, um “varredor” de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica. ....	124
4.10.5.4 Quantificação da produção de ânion superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) “ <i>in situ</i> ”. ....	126
4.10.5.4.1 Quantificação da produção de ânion superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) “ <i>in situ</i> ” através quimioluminescência dependente de Lucigenina (QL <sub>Luc</sub> ). ....	126

4.10.5.4.2	Quantificação da produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) “in situ” através da fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE).	127
<b>4.10.6</b>	<b>Participação dos prostanóides derivados da Ciclooxigenase no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.</b>	<b>128</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>131</b>
5.1.	CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CHUMBO	131
5.2	EFEITO DO CHUMBO NA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E NA ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) PLASMÁTICA	133
5.3	EFEITO DO CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA NA AORTA	135
5.4	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDÓTELIO	137
5.5	FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO CHUMBO SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA	139
5.5.1	Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na via do Óxido Nítrico	139
5.5.2	Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre os canais para $K^+$	142
5.5.3	Participação da Angiotensina II local sobre o efeito do chumbo na resposta contrátil à fenilefrina	143
5.5.4	Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na via dos radicais livres	146

5.5.5 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre os prostanóides derivados da ciclooxigenase.....	148
5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A EXPOSIÇÃO POR SETE DIAS AO ACETATO DE CHUMBO.....	149
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>151</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>152</b>
Anexo .....	177

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Valores Médios do peso corporal (g) no início e ao término da exposição por sete dias ao acetato de chumbo. .... 95

**Tabela 2:** Valores de resposta contrátil ao Cloreto de Potássio (KCl) em anéis isolados de aorta, com endotélio de ratos Wistar dos grupos Controle (CT E<sup>+</sup>) e do Chumbo (Pb<sup>+2</sup>). .... 99

**Tabela 3:** Valores de resposta contrátil ao Cloreto de Potássio (KCl) em anéis isolados de aorta desnudos de ratos Wistar dos grupos Controle (CT E<sup>-</sup>) e Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>-</sup>). .... 99

**Tabela 4:** Valores de resposta máxima (R<sub>máx</sub>, g) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas intactos de ratos Wistar dos grupos Controle (CT E<sup>+</sup>) e Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>). ... 100

**Tabela 5:** Valores de resposta máxima (R<sub>máx</sub>, g) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas sem endotélio de ratos Wistar dos grupos Controle (CT E<sup>-</sup>) e na Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>-</sup>). .... 101

**Tabela 6:** Valores de resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis (intactos e desnudos) de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle e Chumbo. .... 102

**Tabela 7:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais do grupos: Controle (ACh CT) e Chumbo (ACh Pb<sup>+2</sup>). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com à fenilefrina. .... 104



**Tabela 8:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) induzida pelo nitroprussiato de sódio em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (NPS CT) e Chumbo (NPS Pb<sup>+2</sup>). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contração com fenilefrina..... 105

**Tabela 9:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo , na presença e na ausência de L-NAME..... 107

**Tabela 10:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Aminoguanidina..... 111

**Tabela 11:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de TEA.114

**Tabela 12:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Enalapril. .... 117

**Tabela 13:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Losartan. .... 118

**Tabela 14:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de rato

Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Apocinina.....	122
---	-----

**Tabela 15:** Resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e a sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de SOD.123

**Tabela 16:** Resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e a sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Catalase. .... 125

**Tabela 17:** Resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e a sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Indometacina..... 128

**Tabela 18:** Resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e a sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Conrole e Chumbo, na presença e na ausência de Indometacina + L-NAME. .... 129

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Efeitos NO endotelial. A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular. (modificado de Rattmann, 2009). .....57

**Figura 2:** Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio vascular. São três as principais vias endoteliais que geram a vasodilatação: a via da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Dependendo do tipo de vaso, todas estas vias podem ser ativadas após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do Ca<sup>2+</sup>. Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, estes mediadores exercem suas ações nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiros AMPc ou GMPc, ou ainda através da hiperpolarização. (modificado de Rattmann, 2009)..63

**Figura 3:** A disfunção endotelial: Alteração considerada precursora das doenças cardiovasculares e caracterizada pela redução da liberação dos mediadores vasodilatadores. As flechas pontilhadas indicam diminuição da secreção, enquanto as flechas espessas indicam aumento da secreção. ( modificado de Rattmann, 2009).....74

**Figura 4:** (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4mm (Angeli, 2009). .....79

**Figura 5:** Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems* (modificado de Dias, 2007).....80

**Figura 6:** Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina (Fe)  $10^{-6}$ M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh)  $10^{-5}$ M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (modificado de Dias, 2007). .....81

**Figura 7:** Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$ M) (Angeli, 2009).....84

**Figura 8:** Análise dos valores de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medidos por meio de da pletismografia de cauda em ratos do grupo Controle e Chumbo, durante duas semanas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. ANOVA (duas vias),  $*p < 0,05$  (CT=  $121 \pm 1,50$  mmHg,  $n = 10$  vs  $Pb^{+2} = 137 \pm 2,36$ mmHg,  $n = 10$ )......96

**Figura 9:** Atividade da ECA (nMol His-Leu/mL/min) no plasma de ratos dos grupos Controle e Chumbo. O número de animais está demonstrado entre parênteses. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t  $*p < 0,05$  CT vs  $Pb^{+2}$ .....97

**Figura 10:** Correlação entre a atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina (ECA) (nMol) e a pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg) em ratos controle (A) e tratados por sete dias com acetato de chumbo (B).....98

**Figura 11:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos Controle (CT E<sup>+</sup>) e Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste t não-pareado. \*p< 0,05 para R<sub>máx</sub>: CT E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> ..... 100

**Figura 12:** Efeito da remoção do endotélio (E<sup>-</sup>) na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle (CT E<sup>-</sup>) e Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>-</sup>). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste t não-pareado. A análise foi realizada através do Teste t não pareado para comparações de R<sub>max</sub> e pD<sub>2</sub>; p>0,05 (CTE<sup>-</sup> vs Pb<sup>+2</sup> E<sup>-</sup>). .....101

**Figura 13:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a retirada do endotélio (CT E<sup>-</sup>); (B) Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>) e após a retirada do endotélio (Pb<sup>+2</sup> E<sup>-</sup>); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo entre os grupos: Controle (não-prenchido) e Chumbo (preenchido). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste t não-pareado. #p< 0,05 para pD<sub>2</sub> e R<sub>máx</sub>= CT E<sup>+</sup> vs CT E<sup>-</sup>; \*p< 0,05 para pD<sub>2</sub> e R<sub>máx</sub>= Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup> E<sup>-</sup> - e % dAUC - CT E<sup>+</sup> e E<sup>-</sup> vs Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> e E<sup>-</sup>..... 103

**Figura 14:** Curvas concentração-resposta à acetilcolina para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle (ACh CT) e Chumbo (ACh Pb<sup>+2</sup>). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contração com fenilefrina. Teste t não-pareado. p> 0,05. .... 104

**Figura 15:** Curvas concentração-resposta ao NPS para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle (NPS CT) e Chumbo (NPS Pb<sup>+2</sup>). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste t não-pareado. p> 0,05..... 106

**Figura 16:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a incubação com L-NAME (L-NAME CT E<sup>+</sup>); (B) Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>) e após a incubação com L-NAME ( L-NAME Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos: Controle (não-preenchido) e Chumbo (preenchido). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste t não-pareado. #p< 0,05 para CT E<sup>+</sup>vs CT E<sup>+</sup>L-NAME; \*p< 0,05 para pD<sub>2</sub> e R<sub>máx</sub>= Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>vs Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> L-NAME - e % dAUC - CT vs Pb<sup>+2</sup>..... 108

**Figura 17:** Resultados da expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos CT (n=10) e Pb<sup>+2</sup> (n=10). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da eNOS e da α actina. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas da eNOS e da α actina. Teste t: p>0,05. ... 109

**Figura 18:** Resultados da expressão protéica da isoforma fosforilada endotelial da sintase do óxido nítrico (p-eNOS) em relação à isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos CT (n=7) e Pb<sup>+2</sup> (n=7). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da p-eNOS abaixo da eNOS. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como razão entre a densidade das bandas da p-eNOS e da eNOS. Teste t: \*p<0,05. .... 110

**Figura 19:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a incubação com AMG (AMG CT

E); e (B) Cumbo ( $Pb^{+2} E^{+}$ ) e após a incubação com AMG ( $Pb^{+2} E^{+}$ ). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t não-pareado.  $p > 0,05$  para  $R_{\text{máx}}$ : CT  $E^{+}$  vs AMG CT;  $*p < 0,05$  para  $R_{\text{máx}}$ :  $Pb^{+2} E^{+}$  vs  $Pb^{+2}$ AMG. ....112

**Figura 20:** Resultados da expressão protéica da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos CT (n=10) e  $Pb^{+2}$  (n=10). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da iNOS e da  $\alpha$  actina. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas da iNOS e da  $\alpha$  actina. Teste t:  $*p < 0,05$ . ...113

**Figura 21:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT  $E^{+}$ ) e após a incubação com TEA (CT  $E^{+}$ TEA); (B) Chumbo ( $Pb^{+2} E^{+}$ ) e após a incubação com TEA ( $Pb^{+2} E^{+}$ ). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t não-pareado. C) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos Controle (não-preenchido) e Chumbo (preenchido).  $^{\#}p < 0,05$  para  $R_{\text{máx}}$  e  $pD_2$  : CT  $E^{+}$  vs CT  $E^{+}$ TEA ;  $*p < 0,05$  para  $R_{\text{máx}}$ :  $Pb^{+2} E^{+}$  vs  $Pb^{+2}$ TEA. ....115

**Figura 22:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT  $E^{+}$ ) e após a incubação com Enalapril (CT  $E^{+}$  Enalapril); (B) Chumbo ( $Pb^{+2} E^{+}$ ) e após a incubação com Enalapril ( $Pb^{+2} E^{+}$  Enalapril); O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t não-pareado.  $p > 0,05$  para  $R_{\text{máx}}$  e  $pD_2$ : CT  $E^{+}$  vs CT  $E^{+}$  Enalapril;  $*p < 0,05$   $R_{\text{máx}}$ :  $Pb^{+2} E^{+}$  vs  $Pb^{+2} E^{+}$  Enalapril.....117

**Figura 23:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Contole (CT  $E^{+}$ ) e após a incubação com Losartan (CT  $E^{+}$ Losartan); (B) Chumbo ( $Pb^{+2} E^{+}$ ) e após a incubação com Losartan ( $Pb^{+2} E^{+}$  Losartan). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM;  $*p < 0,05$   $R_{\text{máx}}$ :  $Pb^{+2} E^{+}$  vs  $Pb^{+2} E^{+}$ Losartan. ....119

**Figura 24:** Resultados da expressão protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT<sub>1</sub>, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos CT (n=10) e Pb<sup>+2</sup> (n=10). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT<sub>1</sub> e da  $\alpha$  actina. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor AT<sub>1</sub> e da  $\alpha$  actina. Teste t: p>0,05 CT vs Pb<sup>+2</sup>. 120

**Figura 25:** Resultados da expressão protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT<sub>2</sub>, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos CT (n=10) e Pb<sup>+2</sup> (n=10). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT<sub>2</sub> e da  $\alpha$  actina. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor AT<sub>2</sub> e da  $\alpha$  actina. Teste t: p>0,05 CT vs Pb<sup>+2</sup>. 121

**Figura 26:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a incubação com Apocinina (CT E<sup>+</sup>APO); (B) Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>) e após a incubação com Apocinina (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>APO). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; \*p< 0,05 R<sub>máx</sub>: Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>Apocinina. .... 122

**Figura 27:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a incubação com SOD (CT E<sup>+</sup>SOD); (B) Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>) e após a incubação com SOD (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>SOD). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; \*p< 0,05 R<sub>máx</sub>: Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>SOD. .... 124

**Figura 28:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a incubação com Catalase (CT E<sup>+</sup> CAT); (B) Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>) e após a incubação com Catalase (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>CAT). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; \*p< 0,05 R<sub>máx</sub>: Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>CAT..... 125



**Figura 29:** Produção de  $O_2^-$  em anéis de aortas dos grupos CT e  $Pb^{+2}$ . O número de animais está demonstrado entre parênteses. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t  $*p < 0,05$  CT vs  $Pb^{+2}$ . ..... 126

**Figura 30:** Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo (B). Gráfico com valores médios da fluorescência emitida por dihidroetídio (C). Teste t:  $*p < 0,05$ . ..... 127

**Figura 31:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT  $E^+$ ) e após a incubação com Indometacina (Indo CT  $E^+$ ); (B) Chumbo ( $Pb^{+2}$   $E^+$ ) e após a incubação com Indometacina (Indo  $Pb^{+2}$   $E^+$ ). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t não-pareado.  $p > 0,05$  para  $R_{m\acute{a}x}$  e  $pD_2$ : CT  $E^+$  vs Indo CT;  $Pb^{+2}$   $E^+$  vs Indo  $Pb^{+2}$ . ..... 129

**Figura 32:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT  $E^+$ ) e após a incubação com Indo + L-NAME (CT  $E^+$ Indo + L-NAME); (B) Chumbo ( $Pb^{+2}$   $E^+$ ) e após a incubação com Indo + L-NAME ( $Pb^{+2}$   $E^+$ Indo+L-NAME); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos Controle (não-preenchido e cinza claro) e Chumbo (preenchido e cinza escuro). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t não-pareado.  $^{\#}p < 0,05$  para  $pD_2$  e  $R_{m\acute{a}x}$ : CT  $E^+$  vs CT  $E^+$ Indo + L-NAME,  $*p < 0,05$  para  $pD_2$  e  $R_{m\acute{a}x}$ :  $Pb^{+2}$   $E^+$  vs  $Pb^{+2}$   $E^+$  Indo + L-NAME - e % dAUC - ANOVA  $*p < 0,05$  para CT  $E^+$ / CT  $E^+$ L-NAME vs  $Pb^{+2}$   $E^+$ /  $Pb^{+2}$  L-NAME;  $^{\#}p < 0,05$  para CT  $E^+$ / CT  $E^+$ L-NAME +Indo vs  $Pb^{+2}$   $E^+$ /  $Pb^{+2}$  L-NAME +Indo;  $p > 0,05$  para  $Pb^{+2}$   $E^+$ /  $Pb^{+2}$  L-NAME vs  $Pb^{+2}$   $E^+$ /  $Pb^{+2}$ L-NAME +Indo e  $p > 0,05$  para CT  $E^+$  /CTE<sup>+</sup>L-NAME vs CT  $E^+$  / CT  $E^+$ L-NAME+Indo. .... 130

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

1,4,5 – inositol trifosfato ( $IP_3$ )

3,5 – monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)

5 Hyfroxytryptamine (5-HT)

5'-trifosfato de adenosina (ATP)

Porcentagem (%)

cido hipocloroso ( $HOCl^-$ )

cido  $\delta$ -amino levulínico (ALAD)

cido  $\delta$ -amino levulínico desidratase (ALAD)

Acetilcolina (ACh)

Adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)

Adenosina difosfato (ADP)

Adenosina trifosfato (ATP)

Agência de Proteo Ambiental Norte Americana (USEPA)

Agency for Research on Cancer (IARC)

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)

gua ( $H_2O$ )

American Pediatric Association (APA)

Aminoguanidina (AMG)

nion superóxido ( $O_2^-$ )

reas abaixo da curva (AUC)

Apocinina (Apo)

Bradicinina (BK),

Bomba de  $Ca^{+2}$  sensível ao ATP ( $Ca^{+2}$  ATPase)

Bomba sódio-potássio sensível ao ATP (NKA)

Canais de  $K^+$  de larga condutância, ativados por alterações de  $Ca^{+2}$  intracelular ( $BK_{Ca}$ )

Canais de  $K^+$  de intermediária condutância, ativados por alterações de  $Ca^{+2}$  intracelular ( $IK_{Ca}$ )

Canais de  $K^+$  de baixa condutância, ativados por alterações de  $Ca^{+2}$  intracelular ( $SK_{Ca}$ )

Canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{+2}$  ( $K_{Ca+2}$ )

Canais de  $K_+$  retificador ( $K_{ir}$ )

Canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ )

Canais de  $K^+$  voltagem dependentes ( $K_v$ )

Ciclooxigenase (COX)

Cloreto de potássio (KCl)

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Companhia Brasileira de Chumbo (Cobrac)

Concentração intracelular de  $Ca^{+2}$  ( $[Ca^{+2}]_{cit}$ )

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)

Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES)

Débito cardíaco (DC)

Diacilglicerol (DAG)

Diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC)

Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM)

Endotelina (ET)

Endotelina-1 (ET-1)

Endotelina-2 (ET-2)

Endotelina-3 (ET-3).

Endotélio íntegro ( $E^+$ )

Endotélio removido mecanicamente ( $E^-$ )

Enzima conversora de angiotensina (ECA)

Enzima conversora da angiotensina II (ECA II)

Enzima fosfolipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>)

Erro padrão da média (EPM)

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

Fenilefrina (FE)

Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)

Flavina mononucleotídeo (FMN)

Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (FAPES)

Fundo Estadual de Ciência e Tecnologia (FUNCITEC)

Glutadiona peroxidase (GPx)

Grupo Controle (CT)

Grupo Chumbo ( $Pb^{+2}$ )

Graus Celsius ( $^{\circ}C$ )

Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

Indometacina (Indo)

International Lead Zinc Study Group (ILZSG)

Inibidor não-seletivo da NOS, o  $N^{\square}$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

Intra peritonal (*i.m*)

Imunoglobulina E (IgE)

Isoforma da ciclooxigenase tipo 1 (COX-1)

Isoforma da ciclooxigenase tipo 2 (COX-2)

Isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS)

Isoforma induzível da sintase de óxido nítrico (iNOS)

Isoforma neuronal da sintase de óxido nítrico (iNOS)

Malondialdeído (MDA)

Ministério da Saúde (MS)

Minuto (min)

Mitogen-activated protein(MAPKs)

Molar (M)

Músculo liso vascular (MLV)

Nitroprussiato de sódio (NPS).

Norma Regulamentadora nº 7 do Ministério do Trabalho (NR7)

Óxido nítrico (NO)

Óxido nítrico sintase (NOS)

Quimioluminescência dependente de lucigenina (QL<sub>Luc</sub>)

Pressão arterial (PA)

Pressão arterial sistólica (PAS)

Pressão arterial diastólica (PAD)

Íon chumbo (Pb<sup>+2</sup>)

Partículas por milhão( ppm)

Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),

Peróxido de nitrito (ONOO<sup>-</sup>)

Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)

Prostaglandina D<sub>2</sub> (PD<sub>2</sub>)

Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

Prostaciclina F<sub>2α</sub> (PG F<sub>2α</sub>)

Prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>)

Prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)

Prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>)

Proteína quinase A (PKA)

Proteína quinase dependente de AMPc (AMPK)

Proteína quinase G (PKG)

Proteína serina treonina (AKT)

Quinase II dependente da calmodulina (CaMK II)

Radical sulfidril (-SH)

Radical hidroxila (-OH)

Receptor de angiotensina do subtipo 1(AT<sub>1</sub>)

Receptor de angiotensina do subtipo 2(AT<sub>2</sub>)

Receptor de angiotensina do subtipo 3(AT<sub>3</sub>)

Receptor de angiotensina do subtipo 4(AT<sub>4</sub>)

Resistência vascular periférica (RVP)

Resposta máxima (R<sub>máx</sub>)

Retículo sarcoplasmático (RS)

Sensibilidade (pD<sub>2</sub>)

Serina (Ser)

Sintase da prostaglandina H (PGHS)

Sistema nervoso central (SNC)

Sistema nervoso periférico (SNP)

Sistema renina angiotensina (SRA)

Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

Substância P (SP),

Superóxido dismutase (SOD)

Superóxido dismutase cobre/zinco (Cu/Zn SOD; SOD1)

Superóxido dismutase mitocondrial (Mn SOD; SOD2)

Superóxido dismutase extracelular (ECSOD; SOD3)

Tetraetilamônio (TEA)

Tetrahidropterina (BH<sub>4</sub>)

The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)

Treonina (Thr)

Trifosfato de guanosina (GTP).

Tromboxano (TXA<sub>2</sub>)

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Ventrículo direito (VD)

Ventrículo esquerdo (VE)

## RESUMO

Exposição crônica de chumbo induz hipertensão em humanos e animais, causando, entre outros efeitos, disfunção endotelial. Entretanto, efeitos precoces com baixa concentração de chumbo não foram explorados ainda. Nós investigamos os efeitos por sete dias do tratamento com acetato de chumbo sobre a modulação endotelial de tônus vascular em anéis de aorta. Ratos Wistar foram tratados com acetato de chumbo por sete dias (1ª dose 4 µg/100g e doses subsequentes de 0,55 µg/100g *im*) ou veículo. A concentração de chumbo sanguínea ao final do tratamento foi 9.98 µg/dL ± 1.70 µg/dL e houve aumento de pressão arterial sistólica (PAS) comparado ao grupo controle (CT= 121 ± 1,50 mmHg, n= 12 vs Pb<sup>2+</sup>= 137 ± 2,36 mmHg, n= 12) . Em anéis de aorta, o metal reduziu a resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e não modificou a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) na curva concentração-resposta à fenilefrina (10<sup>-10</sup>–3.10<sup>-4</sup>M). A resposta vasodilatadora à acetilcolina (10<sup>-11</sup> – 3.10<sup>-4</sup> M) e ao nitroprussiato de sódio (NPS, 10<sup>-11</sup> - 3.10<sup>-4</sup> M) não foi modificada com o tratamento. A ausência do endotélio ou a incubação com L-NAME (100 µM) ou TEA (2 mM) aumentou a resposta vasoconstrictora induzida pela fenilefrina em ambos os grupos, mas este efeito foi maior em grupo tratado com chumbo. A incubação com Aminoguanidina (50 µM) aumentou a resposta vasoconstrictora induzida pela fenilefrina somente em aortas de ratos tratados com chumbo. A incubação com losartan (10 µM), enalapril (10 µM), apocinina (0.3 µM), SOD (150 U ml<sup>-1</sup>) e catalase (1000 U/ml) diminuíram a resposta vasoconstrictora induzida pela fenilefrina somente em aortas de ratos tratados com chumbo. A indometacina (10 µM) não modificou a reatividade vascular à fenilefrina em ambos os grupos experimentais. A atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina (ECA) aumentou após tratamento com chumbo. Houve significativa correlação entre a PAS e a atividade da ECA, provavelmente sendo este um dos possíveis mediadores do aumento de pressão arterial. No entanto, o aumento de PAS foi acompanhado de redução da reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta. Essa redução de reatividade vascular parece envolver um aumento da biodisponibilidade do NO e foi acompanhada do aumento da expressão protéica da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) e da isoforma fosforilada endotelial da sintase do óxido nítrico no resíduo Ser<sup>1177</sup> (p-eNOS), com significativo aumento da razão p-eNOS/eNOS em aortas de ratos tratados. Houve, também, aumento da participação de canais para K<sup>+</sup>, contribuindo para redução da



reatividade vascular. O aumento da atividade da ECA associada ao aumento da liberação de angiotensina II local poderiam ativar a NADPH oxidase e consequentemente aumentar as EROs. Apesar do envolvimento do sistema renina-angiotensina e das EROs nesse modelo experimental, os efeitos vasodilatadores do NO e da participação dos canais para  $K^+$  foram mais expressivos e contribuíram para redução da reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta, possivelmente como mecanismo compensatório à elevação da pressão arterial sistólica.

**Palavras-chave:** chumbo, reatividade vascular, óxido nítrico, canais de potássio, sistema renina-angiotensina, espécies reativas de oxigênio.

## ABSTRACT

Chronic lead exposure induces hypertension in humans and animals affecting, among other actions, endothelial function. However, exposure for short periods with low lead concentrations is not explored yet. We investigated the effects of treatment with lead acetate for 7 days on vascular reactivity of aortic rings. Wistar rats were treated with lead for 7 days (1st dose 4 µg/100g, subsequent dose 0.05 µg/100g, i.m. to cover daily loss) or vehicle. Blood levels of lead at the end of treatment were 9.98 µg/dL ± 1.70 µg/dL and increased the systolic blood pressure (SBP) compared with the control group (CT= 121 ± 1.50 mmHg, n=12 vs Pb<sup>2+</sup>= 137 ± 2.36 mmHg, n= 12). In aortic rings, lead reduced the maximal response but did not change sensitivity of concentration-response curves to phenylephrine (10<sup>-9</sup>–10<sup>-4</sup> M). Acetylcholine (10<sup>-11</sup>–3.10<sup>-4</sup> M) or sodium nitroprusside (10<sup>-11</sup>– 3.10<sup>-4</sup> M) induced concentration-dependent relaxations that were unchanged by lead. The endothelium removal, L-NAME (100 µM) and tetraetilamonium (2 mM) incubation, increased the responses to phenylephrine, but these effects were bigger after lead treatment. Aminoguanidine (50 µM) incubation increased the response induced by phenylephrine only in lead-treated rats. Losartan (10 µM), enalapril (10 µM), apocinine (0.3 µM), SOD (150 U ml<sup>-1</sup>) and catalase (1000 U/ml) incubation reduced the response induced by phenylephrine only in lead-treated rats. Indomethacin (10 µM) did not alter vascular reactivity in both experimental groups. The plasma activity of angiotensin converting enzyme (ACE) increased after treatment with lead. There was a significant correlation between SBP and ACE activity, and this is probably one of the possible mediators of increased blood pressure. However, the increase in SBP was accompanied by reduction in vascular reactivity to phenylephrine in aortic rings. This reduction in vascular reactivity appears to involve an increased bioavailability of NO and was accompanied by increased protein expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and of the phosphorylated endothelial nitric oxide synthase at Ser<sup>1177</sup> (p-eNOS), with significant increase of the ratio (p-eNOS)/(eNOS) in aorta from lead-treated rats. There was also increase the participation of K<sup>+</sup> channels, contributing to the vascular reactivity reduction. The increased ACE activity associated with increased local release of angiotensin II could activate NADPH oxidase and consequently increase ROS production. Despite the involvement of the renin-angiotensin system and ROS in this experimental model, the vasodilatory

effects of NO and the involvement of channels for K<sup>+</sup> were more expressive and contributed to the reduction of vascular reactivity to phenylephrine in aortic rings, possibly as a compensatory mechanism to the increased systolic blood pressure.

**Keywords:** Lead, aortic rings, oxide nitric, potassium channel, renin-angiotensin system, reactive oxygen species

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CHUMBO

#### 1.1.1 História do Chumbo

A palavra chumbo tem origem do latim *plumbum* (Paoliello, 2001; Capitani *et al.*, 2009). O chumbo foi um dos primeiros metais a ser trabalhado pelo homem, sendo conhecido desde 3500 a.C., de acordo com as descobertas arqueológicas feitas no Egito. A peça mais antiga que se conhece está no Museu Britânico e data de 3.800 a.C. Os antigos egípcios utilizaram o chumbo há mais de oito mil anos. Os jardins suspensos da Babilônia eram assoalhados com folhas de chumbo soldadas, e as pedras das pontes eram ligadas por ganchos de ferro soldados com chumbo (Capitani *et al.*, 2009).

Durante o Império Romano o chumbo era fundido e utilizado sozinho ou junto a outros metais na fabricação de armas e utensílios domésticos como copos, taças e recipientes para líquidos e alimentos, além de aquedutos e reservatórios para fermentação e acondicionamento de bebidas alcoólicas. Além disso, os romanos utilizavam também o metal para a fabricação de canos no sistema de esgoto (Capitani *et al.*, 2009).

Os primeiros relatos de intoxicação ocupacional foram pronunciados no século XIX e início do século XX por trabalhadores como: pintores, encanadores e outros. Em 1883, foi realizada na Inglaterra a primeira legislação com relação à proteção de trabalhadores expostos, devido à morte de diversos empregados (em 1882) que utilizavam o chumbo como matéria prima (Stephan, 2007).

Na década de 90, a produção de chumbo metálico no Brasil foi importante, devido à existência de duas grandes fundições primárias utilizadas no refino do minério extraído na Bahia e em Adrianópolis (Paraná). Essas fundições fecharam suas atividades industriais em 1993 e 1996 respectivamente, e desde então a produção nacional do metal tem declinado, representando não mais de 8% do total de chumbo consumido no país por ano (Capitani *et al.*, 2009).

## Introdução

A intoxicação pelo chumbo causa uma das mais antigas doenças ocupacionais, chamada Saturnismo ou Plumbismo. O termo saturnismo é uma referência ao Deus Saturno, idolatrado na Roma Antiga. Os efeitos neurológicos da intoxicação por chumbo foram primeiramente descritos no império romano (Stephan, 2007). Atualmente, os avanços experimentais em modelos animais e populacionais permitiram maior conhecimento sobre o efeito tóxico desse metal. Todavia, é necessário o desenvolvimento de pesquisas na área da toxicologia não só para ampliar o conhecimento dos efeitos tóxicos, mas também para elaboração de medidas preventivas e descobertas de possíveis tratamentos a serem utilizados em casos de intoxicação por esse metal.

### 1.1.2 Características do metal

O chumbo é um metal cinza-azulado, inodoro e maleável. Encontra-se em estado sólido à temperatura ambiente, se funde com facilidade a 327,4 °C com temperatura de vaporização a 1725 °C. Pertence ao grupo IV B da tabela periódica, é representado pelo símbolo Pb, possui número atômico 82 e massa atômica 207 u (IUPAC, 2003).

Esse metal pesado apresenta quatro isótopos de ocorrência natural com as seguintes abundâncias:  $^{204}\text{Pb}$  (1.4%),  $^{206}\text{Pb}$  (24.1%),  $^{207}\text{Pb}$  (22,1%) e  $^{208}\text{Pb}$  (52.4%). Além disso, ele contém quatro elétrons na última camada, sendo que apenas dois ionizam-se rapidamente. Nos compostos inorgânicos, esse cátion, possui estado de oxidação de +2 e +4, sendo o +2 a forma mais prevalente e que representa a maior causa de problemas biológicos (IUPAC, 2003). Na apresentação  $\text{Pb}^{4+}$  o chumbo forma, entre outros, os compostos orgânicos tetrametilchumbo  $\text{Pb}(\text{CH}_3)_4$  e tetraetilchumbo  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ , os mais importantes do ponto de vista comercial, visto que já foram amplamente empregados como aditivos em combustíveis (Conterato, 2007).

Uma vez no ambiente, não é degradado, mas seus compostos se transformam quando expostos à luz solar, ar e/ou água. Se liberado no ar, a chumbo pode percorrer longas distâncias antes de se depositar no solo (ATSDR, 1995).

### 1.1.3 Fontes Naturais do chumbo

O chumbo é relativamente abundante na crosta terrestre, tendo concentração média de 10/ 20 mg/Kg. As maiores fontes naturais de chumbo são as emissões vulcânicas, intemperismo geoquímico e névoas aquáticas. As maiores fontes geológicas de chumbo são as rochas ígneas e metamórficas (WHO, 1995; Paoliello, 2001). Esse metal pode ser encontrado na natureza tanto na forma livre como em associação com diversos outros metais (Paoliello, 2001). O íon estável do chumbo é o  $Pb^{++}$  e combinado com o enxofre forma a galena ( $PbS$  = 86,6% de Pb e 13,4% de S) que é a principal fonte primária e comercial de chumbo. O chumbo ocorre ainda em outras variedades de minérios tais como a cerusita ( $PbCO_3$ ) e a anglesita ( $PbSO_4$ ) (DNPM, 2001; Paoliello, 2001).

Na atmosfera, o chumbo encontra-se na forma particulada. Essas partículas, quando lançadas no ar, podem ser removidas da atmosfera e transferidas para superfícies e compartimentos ambientais por deposição úmida ou seca. Entretanto, o teor de chumbo no solo é muito influenciado pelas atividades antropogênicas e pelo transporte do metal através do ar, oriundo de várias fontes (WHO, 1995; Paoliello, 2001).

### 1.1.4 Fontes Antropogênicas

#### 1.1.4.1 Produção e Consumo Mundial

Além das fontes naturais, a emissão de chumbo ocorre também através de fontes antropogênicas. De acordo com dados apresentados pelo “International Lead Zinc Study Group”- ILZSG (2001), dentre os principais países produtores desse metal nos últimos anos, destacaram-se os Estados Unidos, a China e a Alemanha. Em 2007, os dados publicados pelo mesmo grupo de estudos demonstraram que a produção mundial de minério de chumbo primário, em metal contido, atingiu um total de 3,68 milhões de toneladas, sendo o continente asiático o maior produtor. A produção mundial de chumbo metálico primário, proveniente

## Introdução

da mina, e o secundário, obtido a partir da recuperação do metal de sucatas, alcançaram 8,1 milhões de toneladas, sendo a Ásia e América os maiores produtores (ILZSG, 2007).

Em 2008, as reservas mundialmente conhecidas (medidas mais indicadas) atingiram 171 milhões de toneladas, em termos de metal contido. Os três maiores produtores de minério de chumbo são também os países detentores das maiores reservas do mundo. São eles, na ordem decrescente das reservas: Austrália, 59 milhões de toneladas, China, 36 milhões de toneladas e Estados Unidos, 19 milhões de toneladas (DNPM, 2009).

No Brasil, em 2008, as reservas do país aprovadas (medidas mais indicadas) alcançaram, em termo de metal contido, 671,2 mil toneladas. O Estado de Minas Gerais é detentor de uma reserva de 108 mil toneladas (metal contido). Outras reservas estão distribuídas nos estados de São Paulo (SP), Paraná (PR), Rio Grande do Sul (RS), Tocantins (TO), Bahia (BA) (DNPM, 2009).

No Brasil, o chumbo secundário é obtido, principalmente, da reciclagem de baterias automotivas, industriais e das telecomunicações, em usinas refinadoras nos estados de Pernambuco, São Paulo e Rio de Janeiro (DNPM, 2007). Segundo International Lead and Zinc Study Group (ILZSG), a produção secundária do chumbo, em 2007, representou 54% da produção mundial do chumbo refinado. Isto demonstra o grau de sustentabilidade que a sociedade mundial tem buscado para garantir o futuro da humanidade (ILZSG, 2007).

### 1.1.4.2 Uso industrial

O chumbo é o sexto metal de maior utilidade industrial. Após a extração, o minério é britado e moído, o qual pode conter de 3 a 8 % de chumbo, e concentrado por flotação diferencial. O processamento do chumbo inclui as operações de sinterização, fundição (redução) e refinamento. Nas operações de fundição de chumbo os trabalhadores são expostos a diversos agentes tóxicos, como dióxido de enxofre, monóxido de carbono e poeira de chumbo (Paoliello, 2001). Atualmente, esse metal tem sofrido uma concorrência proporcionada pelo

## Introdução

avanço tecnológico ao criar sucedâneos para o uso na construção civil (DNPM, 2009).

Esse cátion pode ser consumido na forma de metal, puro, ou ligado a outros metais, como compostos químicos principalmente na forma de óxidos. Por apresentar excepcional maleabilidade, alta resistência à corrosão, elevada densidade, alta opacidade aos raios X e gama, reação eletroquímica com ácido, estabilidade química no ar, solo e água, esse metal é amplamente utilizado no setor industrial (WHO, 1995). Devido sua alta opacidade aos raios X e gama, o chumbo é utilizado como manta protetora para aparelhos de raio X e apresenta grande importância na blindagem contra radiação nuclear (Paoliello, 2001).

O chumbo metálico é utilizado na produção de lâminas e canos; revestimentos de cabos; ingrediente na solda; em material de revestimento na indústria automotiva e na manufatura de baterias. Esse cátion está presente em uma variedade de ligas amplamente utilizadas no setor industrial. Desse modo, cerca de 40% do chumbo é usado como metal, 25% em ligas e 35% em compostos químicos (ATSDR, 1995).

O chumbo pode formar ligas com outros metais (o arsênio, bismuto e estanho) ou ser adicionado em outras ligas (latão, bronze e aço) para modificar suas características (Paoliello, 2001).

Os óxidos de chumbo são usados nas placas de baterias elétricas e acumuladores ( $PbO$  e  $2PbO.PbO_2$ ), como ingredientes nas tintas ( $Pb_3O_4$ ) e constituintes de vitrificados, esmaltes e vidros. Estima-se que a manufatura da bateria representa cerca de 80% do consumo mundial desse metal (WHO, 1995).

A Resolução CONAMA nº 257/1999 dispõe sobre a destinação das baterias usadas. Estas devem ser entregues pelos usuários aos fabricantes, importadores ou aos distribuidores, para posterior reciclagem. A tendência da reciclagem é crescente, tendo em vista que, os vendedores fazem um pagamento por baterias trocadas, pois, o preço do chumbo, a conscientização ambiental da população e a economia de energia, que proporciona uma usina metalúrgica retrabalhar o metal em vez do concentrado de minério são em torno de 60 a 70% (DNPM, 2009). Na reciclagem da bateria chumbo-ácido estão envolvidos três processos: quebra da bateria, redução e refinamento do chumbo. Dentre as fontes comuns de impacto ambiental desses processos, destacam-se: poeiras



## Introdução

contaminadas com chumbo, chumbo particulado, detritos contaminados e produção de escória (Paoliello, 2001).

Os sais de chumbo formam a base de muitas tintas e pigmentos, porém sua utilização é controlada por alguns países. Nos Estados Unidos, por exemplo, concentrações acima de 0.06% não são permitidas em pinturas internas (WHO, 1995). No Brasil, não existe lei específica que estabeleça limite para o chumbo em tintas (WHO, 1995; NEDER, 1999).

O chumbo tetraetila e tetrametila são exemplos importantes de compostos sintetizados industrialmente, e usados em aditivos em combustíveis, sendo, portanto, fonte de contaminação ambiental. A volatilidade desses compostos é mais baixa que a maior parte dos aditivos de combustíveis. Assim, a evaporação da gasolina tende a concentrar esse composto no líquido residual (WHO, 1989). A fabricação do chumbo tetraetila está diminuindo muito em função das regulamentações ambientais cada vez mais restritivas no mundo. O Brasil foi o primeiro país a eliminar este composto da gasolina, em 1978. O álcool anidro foi o seu substituto (Stephan, 2007).

A indústria química utiliza amplamente o chumbo. O carbonato de chumbo é empregado na síntese do cloreto de polivinila (PVC) (Capitani *et al.*, 2009), o arseniato de chumbo na fabricação de inseticida, o sulfato de chumbo na produção da borracha, o naftaleno de chumbo como secativo e o chumbo tetraetila como aditivo para gasolina, esse último ainda utilizado em alguns países como o México e a Nigéria (Paoliello, 2001).

Atualmente, no Brasil, calcula-se que cerca de 90% do consumo de chumbo metálico provenha de atividades de reciclagem. Os maiores consumidores de chumbo no país são as indústrias de baterias automotivas (80%), seguidos das indústrias de pigmentos com 12% e o setor eletro-eletrônico (solda e ligas) com 8% (Capitani *et al.*, 2009).

Compreendidas as fontes e os meios de utilização desse metal pelo homem, bem como o fato de que todos os organismos vivos estão expostos de alguma forma ao mesmo, uma abordagem quanto ao meio de exposição, cinética e toxicologia do chumbo é necessária.

## Introdução

### 1.1.4.3 Formas de exposição do chumbo

Embora os processos naturais e antropogênicos sejam responsáveis pela liberação de chumbo no ambiente, a contaminação antropogênica (mineração, indústria e transporte) é predominante. Estima-se que as emissões naturais desse metal para a atmosfera (provenientes de vulcões e poeiras dispersas pelo vento) apresentam menor relevância. Fontes atmosféricas de exposição diária ao chumbo são importantes em locais próximos a fundições e refinarias desse metal (Paoliello, 2001).

Estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro em área próxima a uma recicladora de baterias automotivas mostrou concentrações de chumbo no ar atmosférico variando de 0,07 a 183,3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  em amostras distando 25 a 500 metros da fonte de emissão, respectivamente. Considerando o valor limite de 1,5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  estabelecido pela agência de proteção ambiental norte americana (USEPA) para chumbo no ar constatou-se que em 50% das amostras coletadas a 25 metros da indústria esse limite havia sido ultrapassado (Quitério *et al.*, 2001).

O teor de chumbo no solo pode variar de região para região. Em locais próximos das vias de tráfego intenso e de indústrias, os teores de chumbo são mais elevados do que aqueles encontrados em áreas isoladas. No Brasil, com relação à contaminação de solos, os dados mostram aumento dos valores desse metal em áreas ao redor de fundições primárias e secundárias de chumbo na Bahia, Paraná e São Paulo, respectivamente (Paoliello, 2001; Capitani *et al.*, 2009).

O chumbo também pode ser encontrado em água potável em virtude da corrosão de encanamentos de chumbo e em margens de rios onde foram desenvolvidas atividades de refinaria. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece para o chumbo uma concentração máxima de 0,03 mg/L para águas classificadas como doce e de 0,01 mg/L para águas classificadas como salinas (Brasil, 2001).

No Brasil, em 1998, o Ministério da Saúde (MS-685/1998) publicou uma portaria regulando as concentrações máximas de chumbo em alimentos, utilizando dados internacionais sobre limites já estabelecidos nos EUA e na Comunidade Européia. Resultados de estudos sobre contaminação de alimentos

## Introdução

por chumbo no Brasil têm sido publicados com certa frequência a partir de instituições responsáveis pela vigilância sanitária e epidemiológica (Okada *et al.*, 1997).

Exposições ocupacionais ao chumbo que resultam em intoxicação, tanto com sintomatologia moderada ou clínica, ainda ocorrem em muitos países. Embora os adultos sejam os principais envolvidos, a contaminação por esse metal pesado parece acometer também crianças (WHO, 1995). Estudos sobre determinantes das concentrações sanguíneas de chumbo em crianças de diferentes faixas etárias mostraram que o transporte da poeira do chumbo do local de trabalho dos pais ou da pessoa que vive na casa, através de roupas, sapatos, cabelo e pele podem ser importante rota de exposição para crianças (Roscoe *et al.*, 1999; Paoliello, 2001).

Outro exemplo de contaminação por esse metal em crianças e adultos, relacionado com exposição ocupacional e ambiental ocorreu no município de Santo Amaro da Purificação, no estado da Bahia, Brasil. Nesse local, entre 1960 a 1993 funcionou uma fábrica de pelletização de chumbo, a Companhia Brasileira de Chumbo (Cobrac). Esta empresa poluiu intensamente a cidade, os trabalhadores da fundição e seus filhos, e os moradores de regiões próximas à usina foram particularmente afetados. Em 1980, o nível médio de chumbo no sangue de 555 crianças de 1 a 9 anos de idade, residentes a menos de 900 m da fundição, foi de  $59,1 \pm 25,0$  µg/dL (Carvalho *et al.*, 1985). Em 1985, após a adoção de medidas de controle, o nível médio observado em uma amostra de 53 crianças foi de  $36,9 \pm 22,9$  µg/dL (Silvany-Neto *et al.*, 1989). Estes valores são considerados alta intoxicação para crianças, tendo em vista que o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) considera níveis de concentração sanguínea maior ou igual a 10µg/dL excessivas para crianças.

Em 1991, Melo e colaboradores, notificaram todos os indivíduos de 20-50 anos que residiam a menos 500 m da fundição. A concentração sanguínea de chumbo de 256 pessoas que nunca haviam trabalhado na fundição foi  $28,6 \pm 20,6$  µg/dL. Entre os indivíduos ocupacionalmente expostos a concentração sanguínea de chumbo foi de  $59,6 \pm 23,4$  µg/dL. Apesar da desativação da Cobrac em 1993, a população ainda corre riscos de contaminação por causa dos subprodutos de chumbo que foram descartados no terreno ao largo da fábrica, visto que o solo

## Introdução

altamente contaminado passou a ser a principal fonte de poluição ambiental de chumbo em Santo Amaro. O último estudo dos níveis de chumbo no sangue de crianças de 1 a 5 anos de idade, residentes a menos de 1 km da fundição abandonada, revelou nível médio do metal igual a  $17,1 \pm 7,3 \mu\text{g/dL}$ , variando de 2,0 a  $36,2 \mu\text{g/dL}$  (Carvalho *et al.*, 2003).

Mediante as várias formas de exposição ao chumbo, em especial as ocupacionais, alguns países estabeleceram um nível máximo de chumbo no sangue, acima do qual o indivíduo pode ser afastado do ambiente de trabalho (Paoliello, 2001). Nas décadas de 60 e 70 eram comuns níveis de limites máximos de  $100 \mu\text{g/dL}$ . Atualmente, esses níveis foram reduzidos na faixa de 40 à  $60 \mu\text{g/dL}$  em diferentes países (Mayer & Wilson, 1998). Entre as principais ocupações associadas às altas concentrações de chumbo no sangue ( $> 50 \mu\text{g/dL}$ ) pode-se citar: fundição chumbo secundário, manufatura de baterias e PVC, fabricação de vidro e formulações de concentrado de tinta para plástico (Paoliello, 2001).

A Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) recomenda ser segura uma concentração sanguínea de chumbo inferior  $30 \mu\text{g/dL}$  em adultos. Em ambientes de exposição ocupacional os níveis de concentração sanguínea de chumbo não devem exceder  $60 \mu\text{g/dL}$ . Já a American Pediatric Association (APA) considera níveis de concentração sanguínea de chumbo  $\geq 10 \mu\text{g/dL}$  excessivos para crianças.

No Brasil, de acordo com a norma regulamentadora nº 7 (NR7) do Ministério do Trabalho (1988), os valores de referência de normalidade, o qual representa o valor próximo de ser encontrado em uma população não-exposta ocupacionalmente e o Índice Biológico Máximo permitido, são respectivamente, de  $40 \mu\text{g/dL}$  e  $60 \mu\text{g/dL}$  (Brasil, 1988). Segundo a NR-7 (Portaria nº 24, de 29/12/94), estabelece o monitoramento de chumbo através de exames médicos em trabalhadores expostos.

### 1.1.5 Cinética do Chumbo no Organismo Humano

## Introdução

Como descrito anteriormente, o chumbo é um metal amplamente utilizado há milhares de anos. É considerado um contaminante ambiental, devido às inúmeras atividades industriais que favorecem a sua distribuição. Sendo assim, todos os indivíduos possuem chumbo em seus organismos como resultado da exposição a fontes exógenas. Entretanto este metal não possui nenhuma atividade fisiológica e exerce efeitos tóxicos em diversos sistemas do organismo cuja grandeza das manifestações clínicas dependerá da intensidade, do tempo de exposição e da sensibilidade individual (Moreira & Moreira, 2004).

A fim de correlacionar a quantidade de chumbo ambiental e a sua biodisponibilidade com seus efeitos tóxicos no organismo, é importante compreender a interação contínua entre a absorção, distribuição, armazenamento e eliminação deste metal.

O processo de absorção do chumbo proveniente de fontes ambientais depende da quantidade de metal, do seu estado físico e químico, além de ser influenciado por fatores relacionados ao hospedeiro (idade, genética, estado fisiológico) e condições nutricionais (Paoliello, 2001). A maior parte do chumbo entra no organismo humano pelo trato respiratório e gastrointestinal e, somente em sua forma orgânica, pode penetrar no organismo por via cutânea (Brasil, 2006). O trato respiratório é a principal via de absorção do chumbo na exposição ocupacional (Paoliello, 2001).

Estudos cinéticos feitos no homem indicam que o chumbo, após ser absorvido no organismo, se distribui essencialmente em três compartimentos: sangue, tecidos moles e tecidos mineralizados (Rabinowitz *et al.*, 1976; ATSDR, 1995; Paoliello, 2001). A meia-vida desse metal nos três compartimentos é bastante diferente, sendo estimada em 36 dias para o sangue, 40 dias para os tecidos moles e 27 anos para os ossos (Rabinowitz *et al.*, 1976; WHO, 1995). É importante ressaltar que, no trabalhador exposto ao chumbo, a concentração do metal nos ossos aumenta progressivamente no decorrer da exposição, enquanto a dos tecidos moles não. Assim a concentração de chumbo nos ossos reflete exposição antiga e nos tecidos moles, exposição recente (Paoliello, 2001).

Em adultos, aproximadamente 95% da carga corpórea do chumbo encontra-se nos ossos, visto que esse metal é, qualitativamente, um análogo biológico do cálcio, seu sítio primário de deposição é o tecido ósseo. Em face da meia vida longa para o chumbo nos ossos, esse compartimento serve como fonte

## Introdução

endógena do metal para outros compartimentos, muito tempo depois de cessada a exposição (Moreira & Moreira, 2004; WHO, 1995). A mobilização desse cátion para compartimentos sanguíneos, em mulheres grávidas, é de grande importância e constitui um risco para o feto e para mãe (WHO, 1995).

A concentração de chumbo no sangue é menor do que 2% do seu total no organismo, visto que 90% a 99,8% do metal encontram-se ligados a proteína das células vermelhas (Goyer, 1991), e o restante encontra-se no plasma provavelmente ligado à albumina,  $\alpha_2$ -globulina ou como íons livres disponíveis para o transporte aos tecidos. É possível que esta última fração tenha maior importância toxicológica, quando comparado ao chumbo nos eritrócitos, por estar mais biodisponível para atingir os sítios-alvo da ação toxicológica. Todavia, as concentrações plasmáticas de chumbo pouco têm sido mensuradas devido às dificuldades analíticas e, por isso, sua relação com as manifestações tóxicas não está claramente definida (Bergdahl *et al.*, 1997).

O organismo acumula chumbo durante toda a vida e elimina de forma lenta, devido à sua afinidade pelo tecido ósseo. Esse metal é excretado por diferentes vias, entre as quais, incluem-se: a excreção renal (75-80%) e a gastrointestinal (15%). Existem outras fontes de excreção que somadas correspondem 8%, são elas: suor, descamação cutânea, cabelo, as unhas (Tsalev & Zaprianov, 1985; WHO, 1995; Paoliello, 2001) e o leite materno (Paoliello, 2001).

O mecanismo de eliminação do chumbo pela urina não está completamente elucidado. Todavia, Skerfving *et al.* (1993) relatam que a presença de chumbo na urina reflete exposição atual e a medida deste parâmetro tem sido aplicada em saúde ocupacional como teste de exposição. Quanto à excreção gastrointestinal, ocorre pela secreção de glândulas (principalmente pancreática) e pela bile. Todo chumbo não absorvido pelo trato gastrointestinal é eliminado pelas fezes, inclusive aquele proveniente do ar que foi ingerido e não absorvido (Moreira & Moreira, 2004).

Compreendidas a cinética e toxicologia do chumbo, uma abordagem acerca dos efeitos tóxicos desse metal nos diferentes sistemas do organismo far-se-à necessária.

### 1.1.6 Efeito do Chumbo nos diferentes sistemas

O chumbo compromete os sistemas nervoso central, renal, cardiovascular, reprodutor e imunológico (Patrick, 2006). O sistema nervoso é muito sensível à intoxicação por chumbo, sendo que a encefalopatia é um dos mais sérios acometimentos tóxicos induzidos pelo chumbo em adultos e crianças. (Moreira & Moreira, 2004).

Os efeitos tóxicos do chumbo afetam os neurotransmissores dopaminérgicos, colinérgicos e glutaminérgicos do cérebro (Moreira & Moreira, 2004). As crianças são mais susceptíveis a neurotoxicidade do chumbo do que os adultos, visto que este metal interfere no desenvolvimento do sistema nervoso central, na diferenciação celular, sinapses e no crescimento da célula glial. Em adultos e crianças, a toxicidade deste metal está relacionada com irritabilidade, déficit de memória e atenção, e baixo nível cognitivo (Patrick, 2006). Weuve *et al.* (2009) demonstraram que a exposição crônica ao chumbo está associada ao declínio cognitivo em mulheres adultas, enquanto Barth & Schaffer, (2002) evidenciaram redução das habilidades cognitivas em homens.

A exposição ao chumbo também está associada ao déficit do coeficiente de inteligência (QI) em crianças (Lanpherar *et al.*, 2005; Healey *et al.*, 2009). Roy *et al.* (2009) confirmam estes achados em estudo com 814 crianças (3 e 7 anos), expostas ao chumbo na Índia.

Outro acometimento neurológico promovido pela exposição crônica ao chumbo é a neuropatia periférica. Essa doença é caracterizada por paresia nos membros superiores e inferiores. Cordeiro *et al.* (1996) estudaram 20 trabalhadores expostos ao chumbo com concentrações sanguíneas abaixo do Limite de Tolerância Biológica (LTB) brasileiro (60 µg/dL) e concluíram que dentre esses trabalhadores expostos, existiam 7 (35%), com velocidade de condução nervosa no nervo radial esquerdo abaixo do limite da normalidade.

O sistema renal também é afetado pela ação tóxica do chumbo. Tanto exposições agudas quanto crônicas causam danos morfofuncionais renais em animais e humanos (WHO, 1995). A nefropatia aguda induzida pelo chumbo promove alterações e disfunções dos túbulos proximais manifestadas por aminoacidúria, glicosúria e fosfatúria, aumento da excreção renal de sódio e redução da excreção de ácido úrico. A forma aguda é reportada principalmente

## Introdução

em crianças intoxicadas pelo metal, cuja principal via de exposição é a oral (Paoliello, 2001).

A nefropatia crônica induzida pelo chumbo em humanos é reportada em indivíduos ocupacionalmente expostos e caracterizada por fibrose intersticial progressiva (Lillis *et al.*, 1968). Recente estudo experimental mostrou que o tratamento crônico com 150 ppm de acetato de chumbo em ratos Sprague - Dawley desencadeou arteriopatia, injúria tubulointersticial, reduziu da taxa de filtração glomerular e acelerou a doença renal crônica (Roncal *et al.*, 2007).

Investigações epidemiológicas associam a concentração sanguínea de chumbo com a disfunção renal (Payton *et al.*, 1994; Muntner *et al.*, 2003). The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) mostrou que a concentração de chumbo sanguínea foi um fator de risco para o aumento da creatinina sérica (Muntner *et al.*, 2003). Outros estudos demonstram significativa correlação entre a concentração sanguínea de chumbo e o aumento dos níveis de creatinina sérica (Pollock & Ibels, 1988; Gonick, 2008).

Alguns estudos correlacionam a exposição ao chumbo, seus acometimentos renais e a elevação da pressão arterial, através do aumento da densidade de receptores beta adrenérgicos (Tsao *et al.*, 2000) e em consequência uma maior atividade simpática e aumento da produção de renina; acréscimo da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), que localmente causa produção de angiotensina II (Sharifi *et al.*, 2004).

O sistema hematológico é um alvo importante da toxicidade do chumbo, comprometendo a síntese do heme e conseqüentemente causando anemia. A fisiopatologia da anemia que acompanha a intoxicação por chumbo não está totalmente esclarecida e parece ser resultado de vários efeitos inibitórios do chumbo sobre a produção dos eritrócitos (Souza & Tavares, 2009). O chumbo é um cátion divalente ( $Pb^{+2}$ ) que se liga fortemente aos grupos sulfidril das proteínas, o efeito mais conhecido desta propriedade de ligação do chumbo com o grupo-SH é a interferência na síntese do grupo heme, na molécula de hemoglobina, uma vez que o chumbo possui alta afinidade pelos eritrócitos (cerca de 99% do chumbo sanguíneo estão ligados às células vermelhas) (Lawton & Donaldson, 1991; Souza & Tavares, 2009).

Especial atenção tem sido dada à síntese do grupo heme, onde o chumbo inibe diversas enzimas, entre elas o ácido  $\delta$ -amino levulínico desidratase (ALAD).



## Introdução

O ALAD consiste em uma enzima crucial na intoxicação por chumbo, pois sua redução resulta na diminuição da síntese do grupamento heme e no aumento do ácido  $\delta$ -amino levulínico (ALA). O acúmulo do ALA parece estar envolvido no dano oxidativo induzido pelo chumbo causando formação de espécies reativas de oxigênio, o que implica na possibilidade da atividade de ALAD ser um indicador promissor dos danos oxidativos induzidos pelo chumbo em eritrócitos (Patrick, 2006; Souza & Tavares, 2009).

A exposição ao chumbo apresenta risco especial para mulheres em idade produtiva. Borja-Aburto *et al.* (1999) têm demonstrado associação entre a concentração sanguínea de chumbo e aborto espontâneo. Diversos estudos revelam que a exposição ao chumbo durante a gravidez afeta o desenvolvimento físico da criança no período neonatal e na infância (Kosnett *et al.*, 2007). Gonnzalez-Cossio *et al.*, (1997) mostraram redução de peso (g) ao nascimento de crianças expostas ao chumbo durante a gestação. Outro acometimento físico promovido por este metal pesado foi diminuição da circunferência da cabeça de crianças ao nascimento (Rothenberg *et al.*, 1999 b; Hernandez-Avila *et al.*, 2002).

Experimentos populacionais demonstraram que o chumbo também pode prejudicar desenvolvimento do sistema imunológico do feto no período pré-natal e pós-natal, possibilitando o desenvolvimento de doenças auto-imunes e imunossupressores, que parecem estar relacionadas com o aumento da imunoglobulina E (IgE) (Diertert, 2006). Em modelos animais, Snyder *et al.* (2000) mostraram que este metal, em uma concentração sanguínea de 5 mg/dL, promove efeitos imunotóxicos.

Estudo recente evidenciou associação entre exposição ao chumbo e desenvolvimento de câncer (Silbergeld, 2003), principalmente renal (Waalkes *et al.*, 1995; 2004). De acordo com International Agency for Research on Cancer (IARC), este metal é considerado um provável agente cancerígeno.

### 1.1.7 Efeito do Chumbo no Sistema Cardiovascular

Na década de 80, um estudo envolvendo populações ocupacionalmente expostas ao chumbo, promoveu impacto na comunidade científica. Os dados

## Introdução

epidemiológicos obtidos através deste estudo mostraram que a exposição ao metal correlaciona-se com aumento da incidência para hipertensão, acometimentos cardiovasculares e doenças cerebrovasculares (Fanning, 1988). Estes achados contribuíram para novas pesquisas, principalmente àquelas que envolvem os efeitos tóxicos do chumbo sobre sistema cardiovascular.

Posteriormente, estudos derivados do The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) mostraram-se particularmente interessantes, pois correlacionam as concentrações sanguíneas de chumbo aos eventos cardiovasculares e cerebrovasculares em populações expostas ao metal. De acordo com os dados obtidos através do NHANES II, participantes com concentração sanguínea entre 20-29 µg/dL de chumbo apresentam 39% de risco de mortalidade cardiovascular, quando comparados aos sujeitos que apresentavam uma concentração sanguínea de chumbo menor que 10µg/dL (Lustberg & Silbergeld, 2002). Os participantes do NHANES III, também demonstraram significativa correlação entre a concentração sanguínea de chumbo e a mortalidade cardiovascular (Menke *et al.*, 2006).

Múltiplos estudos em modelos animais (Vaziri, *et al.*, 1997, 1999, 2003; Ding *et al.*, 1998; Farmand, *et al.*, 2004; Heydari *et al.*, 2006) e populações humanas (Glenn, *et al.*, 2003, 2006; Kosnett *et al.*, 2007; Navas-Acien *et al.*, 2008) têm mostrado relação entre a exposição ao chumbo e a hipertensão arterial. As evidências são suficientes para inferir uma relação entre a exposição ao chumbo e altos valores pressóricos (NHAMES III).

Em populações humanas, o aumento da pressão arterial tem sido observado também em crianças (Roy *et al.*, 2009), gestantes expostas ao metal (Yazbeck *et al.*, 2009) e indivíduos de raça negra. Vupputurri *et al.* (2003) mostraram que os negros possuem concentrações de chumbo no sangue maiores que os brancos, fato que pode estar relacionado com a divergência de exposição ocupacional entre as raças.

A exposição crônica ao chumbo em modelo animal promove aumento tanto na pressão arterial sistólica (PAS) quanto da pressão arterial diastólica (PAD) (Boscolo & Carmignani, 1988). Outros trabalhos de Carmignani e colaboradores (1999 e 2000), em modelo animal, também demonstraram aumento da PAS.

## Introdução

Um dos mecanismos propostos para explicar os efeitos do chumbo sobre a gênese da hipertensão arterial se justifica no fato de que esse metal está diretamente relacionado com o aumento da atividade simpática (Carmignani *et al.*, 2000), além de promover alterações nas células endoteliais (Gonick *et al.*, 1997) e do músculo liso vascular (Marques *et al.*, 2001). Nesse sentido, a administração crônica desse metal pode induzir a produção e liberação de endotelina (Khalil-Manesh *et al.*, 1993), de radicais livres (Gonick *et al.*, 1997; Vaziri *et al.*, 1999) e diminuir a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Vaziri *et al.*, 1997, 1999).

O aumento da produção de radicais livres, resultante da exposição ao chumbo, está diretamente relacionado com a hipertensão arterial. Este metal pesado atua tanto na produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) como na depredação das reservas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutadiona peroxidase (GPx) (Kasperczyk *et al.*, 2004; Patrick, 2006). Em um estudo com 137 trabalhadores expostos ao chumbo, com níveis de altos de concentração sanguínea deste metal (40mg/dL), mostrou significativa redução nos níveis de sanguíneos de GPx, e aumento do *stresse* oxidativo, verificados através da excreção urinária de malondialdeído (MDA) (Kasperczyk *et al.*, 2004).

Os mecanismos pelos quais esse metal atua na produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e na depredação das reservas antioxidantes não estão esclarecidos. Entretanto, sabe-se que o chumbo, por ser um cátion divalente, possui forte afinidade pelo radical sulfidril (-SH) das proteínas, o que pode alterar a atividade de enzimas ou proteínas estruturais. Desse modo, o chumbo pode se ligar a enzimas que possuem o grupo sulfidril e podem causar a inativação de antioxidantes, como a glutadiona que possui o composto tiol (Lynes *et al.*, 2007). Por isso, a concentração sanguínea de glutadiona encontra-se reduzida em animais experimentais e humanos expostos ao metal (Patrick, 2006).

Alterações na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) também parecem estar envolvidas na patogênese da hipertensão arterial. A redução da biodisponibilidade de NO é demonstrada em modelos experimentais de animais tratados cronicamente com acetato de chumbo (Vaziri *et al.*, 1997, 1999; Ding *et al.*, 1998; Carmignani, *et al.*, 2000). Um dos principais mecanismos envolvidos na redução na biodisponibilidade de NO, é o aumento dos níveis de ânion superóxido. Nesta situação o NO reage com o ânion superóxido, formando o peróxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), um agente oxidante. Neste contexto, a produção de EROs

## Introdução

e a redução da biodisponibilidade de NO estão envolvidas na gênese e manutenção da hipertensão arterial em modelos animais e populações humanas expostas ao chumbo (Patrick, 2006; Vaziri & Gonick, 2008).

Outro mecanismo especulativo, pelo qual o chumbo pode alterar a pressão arterial, consiste em sua interferência, direta ou indireta, na homeostasia do cálcio. De maneira indireta, pelo aumento da produção de radicais livres, visto que as EROs, principalmente o radical hidroxila, são capazes de aumentar a  $[Ca^{+2}]$  citosólica em vários tipos celulares (Dreher & Jundon, 1995). De forma direta, o chumbo reduz, competitivamente, com a absorção de minerais (Ercal *et al*, 2001). Valencia *et al*, (2001) sugere que o chumbo possua a capacidade de substituir o cálcio e mimetizar os efeitos deste íon na contratilidade do músculo liso (Valencia *et al*, 2001).

A exposição ao chumbo pode desencadear outros acometimentos cardiovasculares. Prentice & Kopp (1985), por exemplo, mostraram que os corações de ratos perfundidos com 30 $\mu$ M de chumbo apresentaram redução do fluxo coronariano em relação ao grupo não tratado.

Estudo prévio do nosso laboratório mostrou que a exposição aguda ao acetato de chumbo (100  $\mu$ M) reduziu o desenvolvimento da força isométrica, tensão tetânica e da atividade da ATPase miosínica em tiras de ventrículo direito de ratos (Vassallo *et al.*, 2008). Fiorese e colaboradores (2008) avaliaram a contratilidade miocárdica em músculos papilares de VE antes e após a exposição aguda ao acetato de chumbo (8  $\mu$ M). Os resultados demonstraram efeito inotrópico positivo provocado pela exposição aguda ao chumbo (a força contrátil e sua derivada temporal positiva incrementaram em cerca de 10% e 30%, respectivamente). Após 1 hora de exposição ao metal, os músculos papilares mostraram-se hiperreativos ao uso de um agonista  $\beta$ -adrenérgico. Além disso, as medidas bioquímicas evidenciaram que o chumbo aumentou a atividade ATPásica da NKA (aproximadamente em 140%) e da miosina (aproximadamente em 30%) em relação ao controle. A divergência desses resultados provavelmente deve-se à diferença de concentração de chumbo utilizada em cada estudo.

A reatividade vascular também pode ser alterada pela exposição desse metal pesado. Webb *et al.* (1981), por exemplo, observaram aumento da força contrátil na presença de norepinefrina e metoxamina no leito vascular de ratos tratados com 100  $\mu$ M de acetato de chumbo em relação ao grupo controle.

## Introdução

Corroborando com este achado, Silveira *et al.* (2010), mostraram aumento da reatividade à FE no leito vascular caudal de ratos após perfusão com 100  $\mu$ M de acetato de chumbo.

Estudos de exposição aguda (Marques *et al.*, 2001) e crônica (Karimi *et al.*, 2002; Heydarry *et al.*, 2006) com acetato de chumbo em anéis de aorta têm sido amplamente descritos na comunidade científica. Alguns autores relatam que este metal pode aumentar (Grrizzo *et al.*, 2008; Heydari *et al.*, 2006; Karimi *et al.*, 2002) ou diminuir (Zhang *et al.*, 2009) a reatividade vascular. Estes resultados controversos podem estar relacionados com forma, concentração e o tempo de exposição ao metal.

Apesar de vários estudos apontarem a exposição ao chumbo como fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares os mecanismos pelos quais esse metal promove dano cardiovascular precisam ser melhores esclarecidos. No entanto, ainda são necessários estudos para determinar: as concentrações sanguíneas envolvidas no aumento da pressão arterial; as diferenças entre os efeitos das exposições agudas e crônicas; os mecanismos pelos quais o chumbo provoca estas alterações; se a magnitude da associação é diferente entre criança e adulto; e se há grupos populacionais vulneráveis.

Para melhor compreender os efeitos da exposição ao chumbo nos vasos sanguíneos, é necessária uma breve revisão sobre: hipertensão arterial, músculo liso, endotélio vascular e das substâncias liberadas por este último, que participam na regulação do tônus vascular.

### 1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A elevação da pressão arterial (PA) representa um fator de risco independente, linear e contínuo para doença cardiovascular. A hipertensão arterial (HA) é um importante problema de saúde pública, pois apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados, decorrentes principalmente das suas complicações, tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular periférica (Macmahon, 1995; Pimenta & Oparil, 2010).

## Introdução

A Hipertensão arterial afeta 30% da população mundial, sendo que 95% dos casos são caracterizadas como hipertensão primária, na qual não se encontra uma causa específica. The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 2005-2006) estima que 25% da população dos Estados Unidos com 20 anos ou mais apresentam pré-hipertensão e que 73,6 milhões de americanos são hipertensos (Pimenta & Oparil, 2010).

Segundo a VI Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, no Brasil, em 2007, 29,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares. A principal causa de morte em todas as regiões do nosso país é o acidente vascular cerebral, cujo fator de risco principal é a hipertensão arterial.

No Brasil, indivíduos com valores menores que 120 mmHg de pressão arterial sistólica (PAS), e 80 mmHg de pressão arterial diastólica (PAD) são considerados normotensos. Indivíduos com valores entre 130-139 mmHg de PAS e 85-90mmHg de PAD são classificados como pré-hipertensos e valores acima destes últimos descritos indicam hipertensão arterial (VI Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial).

A hipertensão primária é uma entidade clínica multifatorial. Dentre os fatores que contribuem para sua gênese e/ou manutenção estão incluídos: os fatores intrínsecos e extrínsecos. Entre os fatores intrínsecos, incluem-se alterações funcionais do sistema-renina-angiotensina, aumento da atividade simpática, resistência à insulina, hereditariedade (Harrap, 1994); modificações dos parâmetros hemodinâmicos (alterações no débito cardíaco e na resistência vascular periférica) (Folkow, 1982); e raça (Freis, 1973). Quanto aos fatores extrínsecos pode-se citar: obesidade, sedentarismo, consumo de álcool, tabagismo e aumento do consumo de sal (Bakris & Mesah, 2002) e a exposição a metais pesados como o chumbo (Vaziri *et al.*, 1997, 1999), mercúrio (Vassallo *et al.*, 1999; Cunha *et al.*, 2000) e cádmio (Massó *et al.*, 2007; Gonick, 2008).

A PA está intimamente relacionada com o débito cardíaco (DC) e com a resistência vascular periférica (RVP), ou seja,  $PA = DC \times RVP$ . Assim, fatores capazes de modificar o DC e a RVP, alteram a PA (Folkow, 1982).

A RVP depende de fatores neurais, humorais, estruturais e funcionais do sistema cardiovascular. Dentre as alterações funcionais que podem aumentar a resistência vascular, incluem-se o aumento de cálcio intracelular, que promove aumento da reatividade do músculo liso vascular aos agentes vasoconstrictores

## Introdução

(agonistas  $\alpha_1$  adrenérgicos, fenilefrina e noradrenalina) (Horowitz *et al.*, 1996). Além destes é possível citar, o aumento da atividade simpática, aumento da sensibilidade as proteínas contráteis, aumento da permeabilidade ao íon  $\text{Ca}^{+2}$ , modificações na atividade da bomba de  $\text{Ca}^{+2}$  sensível ao ATP ( $\text{Ca}^{+2}$  ATPase) na membrana plasmática e no retículo sarcoplasmático, e na atividade da bomba de sódio potássio sensível ao ATP (NKA) (Folkow, 1982; Bohr & Webb, 1984; Marín, 1993).

O músculo liso e o endotélio vascular também participam da regulação da PA. O primeiro através do tônus vascular e o segundo, através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras, que regulam este tônus vascular e o crescimento do músculo liso. Acredita-se que a hipertensão arterial é acompanhada por mudanças na função das células endoteliais. Sendo assim, a disfunção endotelial parece contribuir para manutenção do aumento de resistência vascular, favorecendo o processo hipertensivo (Cannon III, 1998; Triggle *et al.*, 2003; Kolluru *et al.*, 2010).

### 1.3 MÚSCULO LISO VASCULAR

O tônus do músculo liso vascular é um fator determinante de resistência vascular. A regulação deste é realizada pelos fatores derivados do endotélio, pressão sanguínea, inervação e por estímulos hormonais. Para deflagrar a sua contração, as células musculares lisas vasculares requerem um aumento na concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático. Este aumento pode resultar tanto do influxo do  $\text{Ca}^{+2}$  através de canais específicos da membrana citoplasmática, quanto de liberação dos estoques intracelulares, como o retículo sarcoplasmático. Deste modo, a oferta do  $\text{Ca}^{+2}$  à maquinaria contrátil será aumentada (Lincoln *et al.*, 2001).

Marques *et al.*, (2001), demonstraram que o tratamento crônico com acetato de chumbo alterou o músculo liso vascular e o endotélio vascular. Estas alterações parecem ser decorrentes da redução da biodisponibilidade de NO e a produção de radicais livres. Para compreender os efeitos do chumbo no sistema

## Introdução

cardiovascular é essencial o conhecimento do endotélio e das vias que participam do controle do tônus vascular (Marques *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2010).

### 1.4 ENDOTÉLIO VASCULAR

Em 1977, Moncada e colaboradores publicaram a primeira indicação de que o endotélio possuía fundamental importância no controle do tônus vascular, através da produção de substâncias vasoativas. Em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram em preparação experimental de aorta de coelhos, o papel que as células endoteliais desempenham no relaxamento vascular em resposta a efetores, como a acetilcolina. Postulou-se assim a existência de um fator de relaxamento vascular derivado do endotélio. Em 1987, outro grupo de pesquisadores, liderados por Palmer, demonstrou que o fator de relaxamento derivado do endotélio era o óxido nítrico (NO).

O endotélio é constituído por uma camada de tecido pavimentoso localizada entre o sangue e o músculo liso vascular, servindo como uma barreira semi-permeável, regulando o fluxo de nutrientes e substâncias. Além disso, o endotélio é fundamental no controle do tônus vascular por liberar vários fatores que modulam a contratilidade e o relaxamento do músculo liso vascular (Triggle, 2003; Kolluru *et al.*, 2010).

As células endoteliais sintetizam e liberam fatores que regulam a angiogênese, as respostas inflamatórias e o tônus vascular. É responsável também pela manutenção do balanço entre a promoção e a inibição da proliferação e migração das células do músculo liso vascular, além de prevenir a agregação plaquetária e a trombose (Félétou & Vanhoutte, 2009).

Os principais fatores relaxantes do endotélio são: óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Furchgott & Zawadzki, 1980) e a prostaciclina (Moncada *et al.*, 1977). Dentre os fatores contráteis, os principais são: a angiotensina II (Skeggs *et al.*, 1954), endotelina-1 (ET-1) (Yanagisawa *et al.*, 1988), ânion superóxido (Rubany & Vanhoutte, 1986) e derivados da via do ácido araquidônico, o tromboxano (TXA<sub>2</sub>) e as prostaciclinas H<sub>2</sub> e F<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub> e PG F<sub>2</sub>).



## Introdução

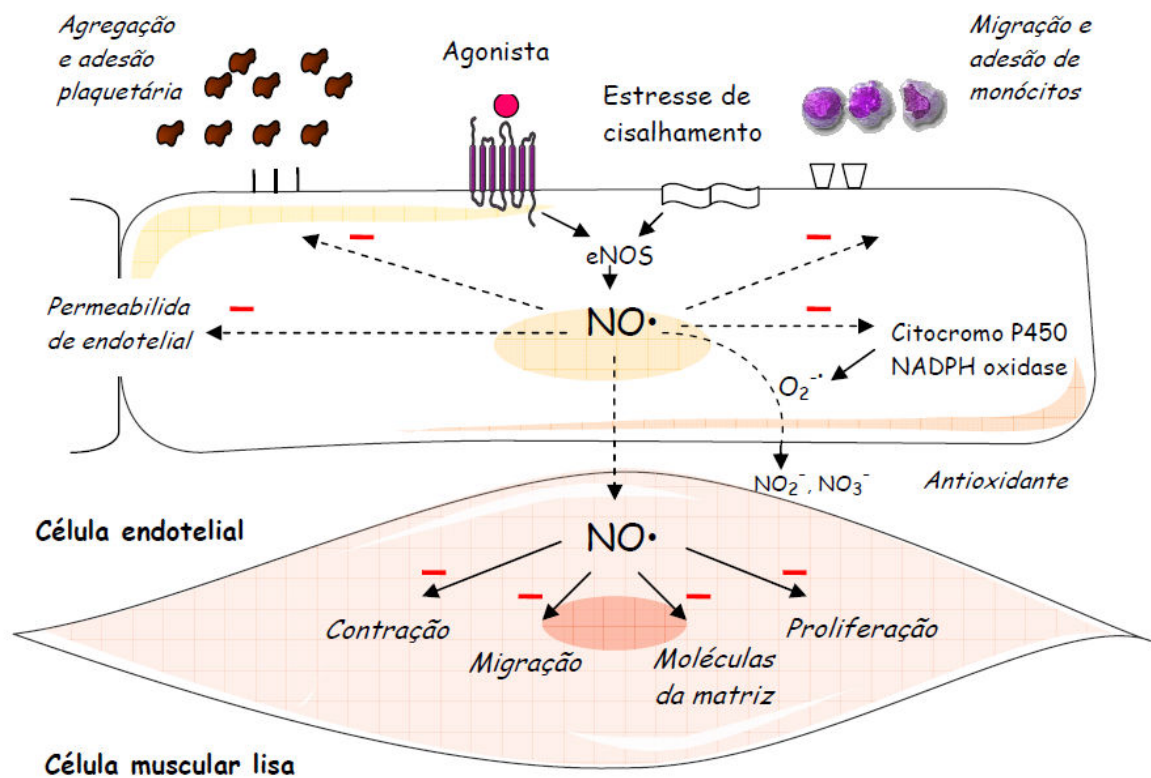
(Frolich & Fortermann, 1989). O equilíbrio na produção desses mediadores é importante para regulação do tônus vascular.

### **1.4.1 Fatores Relaxantes derivados do Endotélio**

#### **1.4.1.1 Óxido Nítrico**

Furchgott e Zawadziki, em 1980, mostraram que o endotélio liberava um fator vasodilatador capaz de modular o tônus vascular, o qual denominou de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDHF). Em 1987, Palmer e colaboradores demonstraram que o EDHF era o óxido nítrico (NO). O NO é um radical livre inorgânico altamente reativo, em estado gasoso, o que o permite difundir facilmente pelas membranas celulares promovendo vasodilatação. Dentre os componentes vasodilatadores do endotélio, o NO é um dos mais importantes participantes, sendo um componente fundamental na manutenção da homeostase dos vasos, incluindo a modulação do tônus vascular através do seu potente efeito vasodilatador. Este radical livre está envolvido regulação do crescimento celular, além de possuir ação inibitória sobre a adesão e agregação plaquetária (Moncada *et al.*, 19991; Cannon III, 1998) (Figura 1).

## Introdução



**Figura 1:** Efeitos NO endotelial. A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular. (modificado de Rattmann, 2009).

O NO é produzido nas células endoteliais a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, que é transformado então em NO e L-citrulina por ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) (Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1991; Triggle *et al.*, 2003; Michel & Vanhoutte., 2010). Para gerar NO é necessária a presença de L-arginina, oxigênio, NAD(P)H (adenina dinucleotídeo fosfato), agrupamento heme e tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Andrew & Mayer, 1999). A produção de NO é estimulada pelas catecolaminas, serotonina, bradicinina, histamina, adenosina difosfato (ADP), substância P, agregação plaquetária, angiotensina II e forças mecânicas como o estresse de cisalhamento (Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1991; Andrew & Mayer, 1999).

Existem três diferentes isoformas de NOS que podem ser divididas em duas classes funcionais. Uma classe é a constitutiva e inclui a isoforma endotelial (eNOS), e uma neuronal encontrada no sistema nervoso central e periférico

## Introdução

(nNOS). Estas são duas isoformas constitutivas dependentes do complexo  $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina, produzindo NO em episódios curtos e em baixas concentrações para finalidades fisiológicas (Andrew & Mayer, 1999).

A isoforma endotelial de NOS (eNOS) é a principal fonte de NO nos vasos. Encontra-se na forma de dímero, e é constituída por dois monômeros idênticos de 134kDa. Localiza-se no complexo de Golgi, membrana plasmática, e nas cavéolas plasmalemais (Fleming & Busse, 1999). A eNOS é somente ativada na sua forma dimerizada. A dimerização da eNOS é dada através do agrupamento heme. A formação deste dímero torna possível sua ligação com a tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), o que proporciona a sua estabilidade (Forstermann *et al.*, 1994; Andrew & Mayer., 1999; McCabe *et al.*, 2000). Dentre os mecanismos que regulam a atividade da eNOS, podemos destacar mudanças no nível de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, associação do complexo  $\text{Ca}^{+2}$ / calmodulina e mudanças intracelulares do pH (Fleming & Busse., 1999).

A quantidade de NO produzida pela eNOS pode ser modulada pela sua fosforilação. Estudos prévios indicam um papel importante da fosforilação da eNOS na regulação de sua atividade e produção de NO (Michel *et al.*, 1993; Dimmeler *et al.*, 1999; Fleming & Busse 2003; Kolluru *et al.*, 2010; Michel & Vanhoutte, 2010; Wang *et al.*, 2010). Esta enzima pode ser fosforilada nos resíduos serina, treonina e tirosina. Dois aminoácidos parecem ser importantes para regulação da atividade da eNOS, um resíduo serina no domínio redutase (na sequência da eNOS humana - Ser<sup>1177</sup> e na eNOS bovina - Ser<sup>1179</sup>) e um resíduo treonina (na sequência da eNOS humana - Thr<sup>495</sup> e na eNOS bovina – Thr<sup>497</sup>) (Fleming *et al.*, 2003; Kolluru *et al.*, 2010 ; Michel & Vanhoutte, 2010).

Em células endoteliais não estimuladas, a Ser<sup>1177</sup> encontra-se não fosforilada, no entanto, esta serina pode ser fosforilada após o estresse de cisalhamento, pelo estrogênio, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), insulina, ou bradicinina (Dimmeler *et al.* 1999; Fleming & Busse., 2003). Dependendo do estímulo, algumas quinases estão envolvidas nesse processo. O estresse de cisalhamento, por exemplo, pode gerar a fosforilação da Ser<sup>1177</sup> através da ativação da proteína serina treonina quinase (Akt) e também da PKA (Dimmeler *et al.* 1999; Fleming & Busse, 2003). O estrógeno e o VEGF fosforilam principalmente a eNOS via Akt. Já a insulina parece ativar ambas as vias da Akt e da proteína quinase ativada pelo AMPc (AMPK), enquanto que a

## Introdução

fosforilação da Ser<sup>1177</sup> induzida pela bradicinina é mediada pela quinase II dependente da calmodulina (CaMKII). (Fleming & Busse, 2003). O resíduo Ser<sup>1177</sup>, quando fosforilado, aumenta a atividade da enzima e a produção de NO (Michel *et al.*, 1993; Dimmeler *et al.*, 1999; McCabe *et al.*, 2000; Fleming & Busse, 2003).

O resíduo Thr<sup>495</sup> tem papel inibitório da atividade da eNOS e quando fosforilado inibe a ligação da calmodulina ao seu domínio nas células endoteliais (Fleming *et al.*, 2003). A quinase envolvida na fosforilação do resíduo de Thr<sup>495</sup> da eNOS é a PKC. (Fleming & Busse, 2003).

A outra classe de NOS é formada pela isoforma induzível (iNOS), um dímero composto por dois monômeros de 130 kDa. Esta isoforma é regulada em nível transcriptional e a sua ativação é independente da interação Ca<sup>+2</sup>/calmodulina. Quando sintetizada, na presença L-arginina e NADPH, a iNOS irá gerar NO por todo o tempo durante o qual a enzima permanecer ativada e em altas concentrações para garantir as atividades antimicrobiana, citostática e imunoregulatória (Forstermann *et al.*, 1994; Andrew & Mayer, 1999). Em situações fisiológicas, a expressão da iNOS não tem grande impacto sobre o sistema cardiovascular. Entretanto, o aumento de sua expressão pode ser induzida em resposta a citocinas e outros mediadores inflamatórios (Alvaréz *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010).

O NO, produzido pelas células endoteliais se difunde rapidamente para as células musculares lisas onde ativa a enzima guanilato ciclase solúvel. Quando ativada, esta enzima promove a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP). O aumento da concentração de GMPc leva à ativação da proteína quinase G (PKG), que atua por diversos mecanismos, promovendo o relaxamento da musculatura lisa vascular (Moncada *et al.*, 1991., Cannon III., 1998).

A PKG ativa canais para K<sup>+</sup> dependentes de Ca<sup>+2</sup>, inibindo assim a entrada de Ca<sup>+2</sup> do conteúdo extracelular pelos canais de cálcio dependentes de voltagem, hiperpolarizando a membrana. Esta proteína quinase pode atuar também no retículo sarcoplasmático (SERCA) estimulando a recaptção do Ca<sup>+2</sup>, na fosforilação da cadeia leve da miosina, tornando-a menos sensível aos íons Ca<sup>+2</sup> e no trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> (estimulando a saída de Ca<sup>+2</sup>) (Lincoln *et al.*, 2001). O NO promove ainda a ativação direta de canais de K<sup>+</sup>, levando a

## Introdução

hiperpolarização da célula muscular lisa (Bolontina *et al.*, 1994; Félétou & Vanhoutte, 1999, 2010; Triggle *et al.*, 2003). Todos estes mecanismos contribuem para a diminuição da  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, e conseqüentemente no relaxamento do músculo liso vascular (Moncada *et al.*, 1991., Cannon III, 1998; Lincoln *et al.*, 2001; Triggle *et al.*, 2003 ).

Os efeitos mediados pelo NO dependem da expressão da NOS, da biodisponibilidade de fatores que regulam a atividade da NOS e das espécies reativas de oxigênio. Existem vários co-fatores que afetam a síntese do NO, dentre eles a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida – NAD(P)H), tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) (Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1991).

A  $\text{BH}_4$  é um co-fator essencial para NOS, capaz de exercer importante efeito na função da NOS, incluindo a estabilização de sua estrutura dimérica. A atividade funcional do dímero da eNOS é dependente do número de moléculas de  $\text{BH}_4$  a ela ligada. A  $\text{BH}_4$  tem um papel decisivo para o transporte de elétrons durante a formação do NO. Uma disponibilidade limitada de  $\text{BH}_4$  para a NOS resultará em desacoplamento da NOS e aumento na produção dos ânions superóxido (Stroes *et al.*, 1998; Frostermann & Munzel, 2006; Takaya *et al.*, 2007; Charttejee & Catravas, 2008).

A redução da biodisponibilidade de NO é considerado como um dos mais importantes fatores associados com doença vascular (Stroes *et al.*, 1998; Kerr *et al.*, 1999; Frostermann & Munzel, 2006). Um dos principais mecanismos envolvidos na redução na biodisponibilidade de NO, é o aumento dos níveis de ânion superóxido. Nesta situação, o NO reage com o ânion superóxido, formando o peróxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Esta reação é mais rápida do que a interação do NO com SOD, contribuindo com a formação de um agente oxidante e na diminuição da biodisponibilidade de NO (Stroes *et al.*, 1998; Frostermann & Munzel, 2006; Takaya *et al.*, 2007).

Estudos prévios demonstram que a exposição crônica ao acetato de chumbo induz a disfunção endotelial e reduz a biodisponibilidade de NO devido ao aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Ding *et al.*, 1998; Vaziri *et al.*, 1999; 2001).

## Introdução

### 1.4.1.2 Prostaciclina

Moncada *et al.* (1977) identificaram a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), o principal metabólito do ácido araquidônico produzido pela ciclooxigenase em células endoteliais (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2010). Assim, o ácido araquidônico sob ação da COX é convertido a prostaglandina  $\text{G}_2$  ( $\text{PGG}_2$ ) e sequencialmente em prostaglandina  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ). Este metabólito é um potente vasodilatador, inibidor de agregação plaquetária, adesão de leucócitos e proliferação do músculo liso vascular (Kawabe *et al.*, 2010). A  $\text{PGH}_2$  através de ações da enzima prostaciclina sintase será convertida em  $\text{PGI}_2$  (Antman *et al.*, 2005).

A atividade  $\text{PGI}_2$  depende dos receptores específicos acoplados a proteína G no músculo liso vascular. Assim, o acoplamento da  $\text{PGI}_2$  com seu receptor preferencial, o receptor de prostaciclina (IR), ativará a adenilato ciclase, e consequentemente, o AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2009). Esta interação também pode estimular a proteína quinase dependente de AMPc (AMPK), no músculo liso vascular. Essa proteína quinase pode atuar abrindo canais para  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP, hiperpolarizando as células do músculo liso vascular e estimulando a saída de  $\text{Ca}^{+2}$  do citosol, diminuindo a oferta deste íon à maquinaria contrátil. Estes fatos contribuem para relaxamento vascular (Davidge, 2001; Kawabe *et al.*, 2010).

A  $\text{PGI}_2$  apresenta efeito protetor no processo aterogênico limitando a ativação plaquetária, adesão de leucócitos no endotélio e no músculo liso vascular (Kawabe *et al.*, 2010). A diminuição da síntese  $\text{PGI}_2$  induziu hipertensão e esclerose arterial em modelos experimentais (Radomski *et al.*, 1987; Félétou & Vanhoutte, 2009).

### 1.4.1.3 Fator Hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

O endotélio controla o tônus vascular não somente pela liberação de NO e prostaciclina, mas também por outra via causando hiperpolarização das células do músculo liso vascular através de fatores hiperpolarizantes derivados do

## Introdução

endotélio (EDHFs) (Félétou & Vanhoutte, 1999). A hiperpolarização de células do músculo liso vascular foi demonstrada por Bolton *et al.* (1984) através de um agonista muscarínico. Posteriormente, este fenômeno foi confirmado em vasos de diferentes espécies (Félétou & Vanhoutte, 1985; 1988). A contribuição de EDHF para a vasodilatação dependente do endotélio é maior nos vasos sanguíneos de resistência do que nos vasos de condutância (Urakami-Harasawa *et al.*, 1997).

A natureza química deste fator endotelial ainda suscita várias interrogações. A vasodilatação induzida por este composto ocorre com participação ativa dos canais de potássio presentes nas células do músculo liso vascular. Em geral, as respostas mediadas pelos EDHFs envolvem o aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, que ao ser liberado, induz vasodilatação por meio da abertura de canais para potássio ativados por  $\text{Ca}^{+2}$ . Assim, a hiperpolarização endotelial é transmitida para o músculo liso vascular através do acoplamento elétrico direto das junções comunicantes (*gap junctions*) ou pela ativação da NKA do músculo liso vascular (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2009).

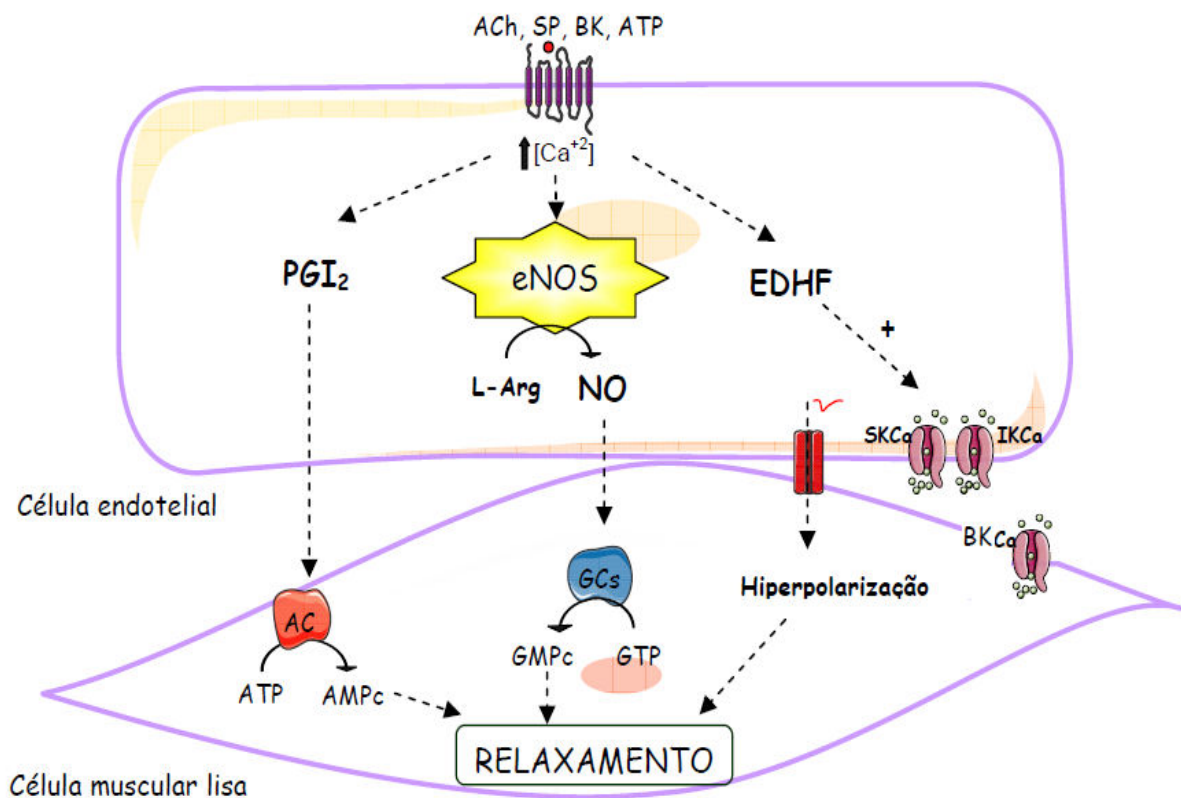
Os canais para  $\text{K}^{+}$  expressos no endotélio e músculo liso vascular contribuem para a manutenção do potencial de membrana, através do efluxo de  $\text{K}^{+}$ , resultando em hiperpolarização da membrana. Esse efeito é seguido do fechamento de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependente e, desta forma, da redução da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e consequente vasodilatação. Desse modo, a inibição desses canais para  $\text{K}^{+}$  levam à despolarização da membrana e à vasoconstrição. Quatro subtipos de canais para  $\text{K}^{+}$  foram identificados e são os responsáveis por executar esta função: os canais para  $\text{K}^{+}$  voltagem dependentes ( $\text{K}_v$ ); os canais para  $\text{K}^{+}$  retificador ( $\text{K}_{ir}$ ); os canais para  $\text{K}^{+}$  sensíveis ao ATP ( $\text{K}_{ATP}$ ) e os canais para  $\text{K}^{+}$  ativados por alterações de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, que podem ser subdivididos em: canais para  $\text{K}^{+}$  de larga condutância ativados por alterações de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular ( $\text{BK}_{Ca}$ ); os canais para  $\text{K}^{+}$  de intermediária condutância ativados por alterações de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular ( $\text{IK}_{Ca}$ ); os canais para  $\text{K}^{+}$  de baixa condutância ativados por alterações de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular ( $\text{SK}_{Ca}$ ); (Nelson & Quayle, 1995; Ledoux *et al.*, 2006; Félétou & Vanhoutte, 2006, 2009).

Outras substâncias hiperpolarizantes derivadas do endotélio, além do NO e da  $\text{PGI}_2$  foram identificadas e atuam através do estímulo destes canais: metabólitos da via do ácido araquidônico-lipogenases; produtos da via do ácido araquidônico- citocromo P450 (ácidos epoxieicosatrienólicos, EETs), peptídeo

## Introdução

natriurético tipo C,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2010) e outros mediadores gasosos ( $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ) (Félétou & Vanhoutte, 2010).

Os fatores responsáveis pela hiperpolarização atribuída ao EDHFs são secretados após a ativação dos receptores agonistas como a acetilcolina (ACh), a substância P (SP), a bradicinina (BK) e o ATP (Figura 2). Além disso, a força de cisalhamento, exercida pelo sangue sobre o endotélio vascular, é capaz de induzir uma vasodilatação pelo aumento da secreção do NO, do EDHF e da prostaciclina. Estas respostas mediadas pelos EDHFs podem ser alteradas em diversas condições patológicas, como na hipertensão arterial, aterosclerose e diabetes mellitus (Triggle *et al.*, 2003; Félétou & Vanhoutte, 2010).



**Figura 2:** Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio vascular. São três as principais vias endoteliais que geram a vasodilatação: a via da prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Dependendo do tipo de vaso, todas estas vias podem ser ativadas após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$ . Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, estes mediadores exercem suas ações nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiros AMPc ou GMPc, ou ainda através da hiperpolarização. (modificado de Rattmann, 2009).



### 1.4.2. Fatores contráteis derivado do endotélio

#### 1.4.2.1 Prostaglandinas vasoconstrictoras

As prostaglandinas (PGs) são também denominadas de eicosanóides por serem derivados de ácidos graxos insaturados de 20 carbonos. Estas substâncias são importantes moduladores do tônus vascular tanto em condições fisiológicas como patológicas (Frolich & Fortermann, 1989). A produção destes eicosanóides é regulada pela disponibilidade do ácido araquidônico e pela atividade da sintase da prostaglandina H (PGHS) (Davidge, 2001).

O ácido araquidônico é formado por fosfolipídeos da membrana através da ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Uma vez liberado, o ácido araquidônico pode ser metabolizado pela ciclooxigenase (COX) e, posteriormente convertido em PGH<sub>2</sub> pelas sintase prostaglandinas H (PGHS). A PGH<sub>2</sub> é a precursora das demais prostaglandinas e possui atividade direta sobre o músculo liso vascular, promovendo vasoconstrição. Por ação de sintases específicas, PGH<sub>2</sub> é convertida em prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), prostaglandina D<sub>2</sub> (PD<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), tromboxano (TXA<sub>2</sub>). As PGF<sub>2α</sub> e TXA<sub>2</sub> são substâncias vasoconstritoras enquanto as demais são vasodilatadoras (Mardini & FitzGerald, 2001).

Nos anos 90, duas isoformas da ciclooxigenase (COX) foram identificadas, a do tipo 1 (COX-1) e do tipo 2 (COX-2). A COX-1 é a isoforma constitutiva, expressa em vários tecidos e está relacionada com as funções fisiológicas. A COX-2 é a isoforma induzida pelas citocinas, fatores mitogênicos e por estímulos pró- inflamatórios em vários tipos de células. A expressão da COX-2 está relacionada com processos inflamatórios e ao *estresse* de cisalhamento (shear stress) (Antman *et al.*, 2009).

O TXA<sub>2</sub> é o maior produto vasoconstritor derivado da ciclooxigenase. A PGF<sub>2α</sub> e o TXA<sub>2</sub> estimulam a atividade contrátil do músculo liso vascular através do acoplamento com receptores específicos. Esta interação levará ao aumento de cálcio intracelular e à maior sensibilidade às proteínas contráteis. As demais prostaglandinas, ao se acoplarem com seus receptores específicos, estimulam a

## Introdução

adenilato ciclase, promovendo aumento do AMPc e o relaxamento do músculo liso vascular (Luscher *et al.*, 1994; Davdge, 2001).

A participação da COX é importante na manutenção do tônus vascular. Entretanto, um desequilíbrio na formação destes prostanóides pode contribuir na fisiopatologia de várias doenças que cursam com processo inflamatório, como a hipertensão arterial, arteriosclerose e diabetes Mellitus (Davdge, 2001). Alvaréz *et al.* (2005) demonstraram aumento da expressão da COX-2 em modelos experimentais de hipertensão.

O efeito do acetato de chumbo interfere no metabolismo do ácido araquidônico (Grizzo *et al.*, 2008; Courtois *et al.*, 2003; Karimi *et al.*, 2002). Estudo prévio em nosso laboratório mostrou o envolvimento de prostanóides vasoconstrictores derivados da COX no leito arterial caudal de ratos perfundidos com acetato de chumbo (100  $\mu$ M) (Silveira *et al.*, 2010). O efeito deste metal sobre a produção dos prostanóides derivados da COX parece contribuir com aumento da pressão arterial (Grizzo *et al.*, 2008).

### 1.4.2.2 Endotelina

Em 1988, um potente peptídeo derivado das células endoteliais foi descoberto. A este peptídeo denominou-se endotelina (ET) (Yanagisawa *et al.*, 1988). Além das células endoteliais, as musculares lisas, fibroblastos, cardiomiócitos, macrófagos e leucócitos também produzem endotelina (ET). Três isoformas de endotelina foram identificadas: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2), e endotelina-3 (ET-3). Essas três isoformas apresentam 21 aminoácidos, mas diferem em dois e cinco resíduos (Luscher *et al.*, 1992; Watts., 2010). A ET-1 é a principal isoforma encontrada no endotélio e no sistema cardiovascular. Cada isoforma de ET exerce seu efeito após unir-se ao seu receptor específico. Foram denominados três tipos de receptores: ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>, ET<sub>C</sub> e, através de ensaios farmacológicos, estes receptores foram divididos em subtipos: ET<sub>A1</sub>, ET<sub>A2</sub>, ET<sub>B1</sub>, ET<sub>B2</sub> (Watts, 2010).

O receptor ET<sub>A</sub> tem maior afinidade com a ET-1 e são expressos principalmente em células musculares lisas, provendo vasoconstrição através da

## Introdução

ativação da fosfolipase C, da proteína quinase (PKC) e do aumento da  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, pelos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  dependentes de voltagem. O subtipo  $\text{ET}_B$  tem afinidade para as três subunidades de ET e é expresso principalmente em células endoteliais. Este subtipo de receptor promove vasodilatação através da ativação da fosfolipase  $A_2$  e da guanilato ciclase que estimulam a liberação de NO (Luscher *et al.*, 1992).

Por sua potente ação vasoconstritora, acredita-se que a ET-1 está associada com a fisiopatologia de múltiplas doenças como a hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e insuficiência renal (Luscher *et al.*, 1992; Watts, 2010)

### 1.4.2.3 Sistema Renina Angiotensina

O sistema Renina Angiotensina (SRA) foi descrito, em 1898, pelo fisiologista finlandês Robert Tigerstedt e seu aluno Per Gunnar Bergman, através da descoberta de um extrato (renina) do córtex renal de ratos, que aumentava a pressão sanguínea. Posteriormente, Goldblatt (1934) induziu a hipertensão em cachorros por constrição da artéria renal. Entre 1939 e 1940, Braun Menendez e Page descobriram a angiotensina. Somente em 1954, Skeggs purificou a angiotensina e mostrou a existência de duas formas, a angiotensina I e II. Dois diferentes tipos de sistemas renina-angiotensina foram identificados: o circulante, descrito desde a descoberta da renina, e o local, descrito mais recentemente e que parece desempenhar papel importante na homeostase circulatória. Ainda hoje os conhecimentos de fisiologia e biologia molecular sobre este sistema continuam crescendo, todavia muitos estudos são necessários para compreender as funções do SRA circulante e local principalmente nos acometimentos cardiovasculares e renais (Hall, 2003).

A interação entre os diferentes componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona determina sua atividade e influencia a regulação da pressão arterial, balanço renal de sódio e risco cardiovascular (Crackower *et al.*, 2002; Lacolly *et al.*, 2009).

Dentre os componentes do SRAA circulante, a angiotensina II merece destaque. A cascata de produção deste octapeptídeo é de forma cíclica, e advém

## Introdução

de reações ocorridas inicialmente na circulação renal e depois na circulação sistêmica. Esta via de ativação se inicia com a liberação de renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais quando estimuladas por uma redução da pressão arterial ou desequilíbrio hidro-eletrolítico. Assim, a pré-pró-renina, um peptídeo não ativo que se transforma em pró-renina. Posteriormente, a pró-renina, através da proteólise celular transforma-se em renina. Esta, ao ser liberada, irá atuar sobre o angiotensinogênio, que será clivado, gerando a angiotensina I. Esta, por sua vez, sofrerá ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) no pulmão, originando a angiotensina II (Crackower *et al.*, 2002; Touyz & Schiffrin, 2000).

A ECA foi primeiramente descrita por Skeggs e colaboradores em 1956. Esta enzima existe no plasma, como um hormônio circulante, no intertício e intracelular. Ela se expressa em diversos tecidos como o endotélio vascular, o endotélio dos túbulos proximais renais, coração, pulmão, rim, adrenal, e órgãos reprodutivos. Seu papel é promover a clivagem dipeptídica carboxi-terminal de alguns peptídios atuando assim, na regulação do tônus vascular pela conversão do peptídeo inativo angiotensina I em angiotensina II (vasoconstrictor), além de inativar a bradicinina (vasodilatadora) e a substância P (Touyz & Schiffrin, 2000).

Recentemente outra enzima participante deste sistema foi identificada, a enzima conversora da angiotensina II (ECA II) que cliva tanto a angiotensina I como a angioensina II em um metabólito denominado angiotensina 1-7, este último com propriedades vasodilatadoras. Deste modo, tanto a ECA I quanto a ECA II são importantes na regulação dos níveis de angiotensina (Crackower *et al.*, 2002).

A angiotensina II exerce efeitos locais, como nos vasos sanguíneos, rins, coração e sistema endócrino. Esta enzima realiza ainda importante papel na regulação da pressão sanguínea (Griedling *et al.*, 1996; Crackower *et al.*, 2002; Lacolly *et al.*, 2009). Soma-se ao potente efeito vasoconstritor da angiotensina II, o estímulo para a liberação de catecolaminas das terminações nervosas, a secreção de aldosterona, redução da natriurese e diurese (Yamazaki *et al.*, 1996).

Os efeitos da angiotensina II sobre o organismo são mediados por receptores específicos da membrana, principalmente com receptor de angiotensina do subtipo 1 (AT<sub>1</sub>) e o receptor de angiotensina do subtipo 2 (AT<sub>2</sub>). Os receptores AT<sub>1</sub> estão presentes em células lisas musculares e adventícias do

## Introdução

vaso. Assim, essa enzima exerce efeito predominante no tônus vascular via interação com o receptor  $AT_1$  (Griendling *et al.*, 1996; Rajagopalan *et al.*, 1996). Os receptores  $AT_2$  são expressos durante o desenvolvimento em fetal, entretanto, esta expressão é amplamente diminuída após o nascimento, sendo restrita a poucos órgãos como o cérebro, adrenal, coração, endotélio vascular, rins e ovários. No coração, o receptor  $AT_2$  está presente em artérias coronárias, cardiomiócitos, e no miocárdio ventricular. Estudos recentes demonstraram aumento da expressão do receptor  $AT_2$  em condições patológicas, como injúria vascular, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e insuficiência renal. O mecanismo de ação deste receptor está relacionado à liberação de NO promovendo relaxamento do músculo liso vascular (Griendling *et al.*, 1996; Steckelings *et al.*, 2005). Outros subtipos de receptores como  $AT_3$  e  $AT_4$  estão presentes em nosso organismo, todavia, seus mecanismos de ações e existência ainda não foram completamente esclarecidos (Griendling *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 2008).

A união entre a angiotensina II com o receptor  $AT_1$  ativa vias mediadas por proteínas G, tirosinas-quinases, e tirosina não quinases. A via mediada pela proteína G ativa as fosfolipases C (PLC),  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>), D (PLD) e as lipogenases. A ativação da fosfolipase C (PLC), forma o diacilglicerol (DAG) e o trifosfato de inositol ( $IP_3$ ). A DAG ativa a PKC que fosforila a bomba de  $Na^+/K^+$ , o trocador  $Na^+/H^+$ ,  $Na^+/Ca^{2+}$  aumentando a concentração de  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  intracelular promovendo vasoconstrição. Por sua vez, o  $IP_3$  eleva a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular culminando em contração do músculo liso vascular (Griendling *et al.*, 1996; Touyz & Schiffrin, 2000; Garrido & Griendling, 2009).

A ativação da PLA<sub>2</sub> leva a produção dos prostanóides derivados da via da COX, que participam do controle do tônus através de estímulos vasodilatadores ( $PGI_2$  e  $PGE_2$ ) e vasoconstritores ( $TXA_2$ ) (Griendling *et al.*, 1996; Touyz & Schiffrin, 2000; Beltrán *et al.*, 2009). A angiotensina II ativa também a PLD, promovendo a hidrólise da fosfatidilcolina em colina e ácido fosfatídico que é convertido em DAG, este estimula a PKC sustentando a contração do músculo liso (Touyz & Schiffrin, 2000). Quando a via das lipooxigenases é ativada ocorre formação de leucotrienos, que estão associados a respostas inflamatórias. Estas características mostram a importância da angiotensina II na manutenção da integridade estrutural e funcional da parede dos vasos e o papel que ela exerce

## Introdução

em doenças cardiovasculares associadas com a contração do músculo liso vascular, como a hipertensão (Touyz & Schiffrin, 2000; Garrido & Griendling, 2009).

A estimulação da angiotensina II ao receptor AT1 causa ainda fosforilação da tirosina-quinase. Esta irá ativar a PKC e as MAPKs (Mitogen-activated protein), influenciando o crescimento e remodelamento vascular (Touyz & Schiffrin, 2000; Beltrán *et al.*, 2009; Garrido & Griendling, 2009), regulando assim o crescimento celular, apoptose, deposição da matriz extracelular (Griendling *et al.*, 1996; Rajagopalan *et al.*, 1996; Hannken *et al.*, 1998; Garrido & Griendling, 2009).

Recentemente, um novo modelo sinalizador para angiotensina II tem sido bem descrito, e este, pode ter importantes implicações para os seus efeitos fisiológicos e fisiopatológicos. Estudo prévio demonstrou que a angiotensina II aumentou a liberação de  $O_2^-$  pelo estímulo da atividade da enzima NADPH oxidase em cultura de células musculares lisas de ratos (Griendling *et al.*, 2000). Este aumento é maior em células de ratos espontaneamente hipertensos do que em normotensos (Cruzado *et al.*, 2005). Outros pesquisadores demonstraram que a hipertensão induzida pela Angiotensina II está associada com o aumento de  $O_2^-$  em ratos Sprague Dawley (Rajagopalan *et al.*, 1996). Em adição, Doughan *et al.* (2008) mostraram que este peptídeo, estimulando a NADPH oxidase, aumentou a produção de  $O_2^-$  e  $ONOO^-$  em células endoteliais aórticas bovinas. Assim, produção de radicais livres induz efeitos deletérios sobre a função mitocondrial e endotelial vascular.

Estudos prévios relacionam a elevação da pressão arterial em animais expostos ao chumbo com alterações do sistema renina- angiotensina (Boscolo & Carminghani, 1988; Vaziri *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007; Sharifi *et al.*, 2004).

A exposição ao chumbo ativa a enzima conversora da angiotensina (ECA) (Sharifi *et al.*, 2004), além de aumentar a atividade plasmática da renina, por estimular a síntese e liberação da mesma pelo aparelho justaglomerular (Boscolo & Carminghani, 1988; Carminghani *et al.*, 1999).

## Introdução

### 1.4.2.4 Espécies reativas de Oxigênio (EROS).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são metabólitos do oxigênio que podem tanto retirar elétrons, doar elétrons ou reagir com outras moléculas. Estas partículas, formadas por elétrons livres ou não pareados, possuem uma instabilidade elétrica muito grande, e assim, apresentam grande capacidade reativa. A fim de captar um elétron para sua estabilização, é capaz de reagir com qualquer composto, seja este uma molécula, célula ou tecido. Por esta característica, é denominado de substância oxidante (Griendling & Ushio-Fukai, 2000; Harrison & Gongora, 2009).

A principal fonte geradora de EROs são as mitocôndrias, assim, a formação destes metabólitos pelo organismo em condições fisiológicas é inevitável, visto que o processo de respiração celular ocorre nesta organela (Cai & Harrison, 2000). Ademais, as EROs, não desencadeiam somente consequências tóxicas do metabolismo celular, mas também são participantes essenciais na sinalização e na regulação celular. Estes metabólitos do oxigênio participam de vias de sinalização intracelular, mudanças de transcrição gênica e síntese de proteínas (Touyz & Schiffrin, 2000). Em condições fisiológicas a produção de EROs e sua eliminação estão sujeitas a um balanço na parede vascular. Todavia, o aumento da atividade de enzimas oxidantes e a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes levam ao estresse oxidativo (Griendling, *et al.*, 2000, 2003)..

Um dos mais importantes radicais para a biologia vascular é o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o qual é formado pela redução univalente do oxigênio (Taniyama & Griendling, 2003; Touyz & Schiffrin, 2004; Harrison & Gongora, 2009). Apesar do  $O_2^-$  poder diretamente promover alterações na função vascular, ele também é fundamental na produção de outras espécies reativas, como quando ocorre sua reação com o NO, a qual leva à produção de substâncias citotóxicas como o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e radicais hidroxila ( $OH^\bullet$ ) (Miller *et al.*, 1998; Beal, 2002; Griendling & FitzGerald, 2003; Taniyama & Griendling, 2003; Cai, 2005). Destas reações pode ocorrer a perda da capacidade vasodilatadora do NO, levando a um predomínio da resposta vasoconstritora dependente do endotélio (Kawashima & Yokoyama, 2004).

## Introdução

A dismutação do  $O_2^-$  pela superóxido dismutase (SOD), produz o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual têm sido convertido enzimaticamente em  $H_2O$  pela catalase e glutadiona peroxidase (GPx) (McIntyre, *et al.*, 1999; Griendling & FitzGerald, 2003, Taniyama & Griendling, 2003) . O  $H_2O_2$  pode atuar como segundo mensageiro, mediando respostas que levam o crescimento do músculo liso vascular, migração celular, apoptose e respostas inflamatórias (Griendling & FitzGerald, 2003; Cai, 2005; Harrison & Gongora, 2009). O  $H_2O_2$  pode ser também metabolizado pelas mieloperoxidases e formar o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) ou reagir com metais de transição formando o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ). Dentre as EROs, o  $O_2^-$ ,  $ONOO^-$  e  $OH^\cdot$  são os mais instáveis e reativos, enquanto  $H_2O_2$  é a mais estável (Taniyama & Griendling, 2003).

A formação das EROs é mediada por algumas enzimas vasculares que incluem a NADPH oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, eNOS, isoenzimas da citocromo P450, lipooxygenase, ciclooxigenase, heme oxygenase e glicose oxidase (Cai & Harrison, 2000). A principal fonte de EROs no endotélio parece ser a NADPH oxidases. Estas enzimas utilizam o NADH ou NADPH como substratos (Cai *et al.*, 2005; Hamilton *et al.*, 2002; Garrido & Griendling, 2009).

A NADPH oxidase é composta por uma membrana integrada, o citocromo b558, o qual é composto de duas subunidades, uma maior denominada gp91phox e outra menor p22phox, além das subunidades citosólicas regulatórias p67phox, p40phox, p47phox e da proteína de baixo peso molecular rac-1 (Griendling, *et al.*, 2000; Hamilton *et al.*, 2002). A subunidade p22phox é descrita como um componente crítico para a geração vascular de ânions superóxido (McIntyre *et al.*, 1999). Subunidades homólogas da gp91phox foram descritas, e estas fazem parte da família da NOX da NADPH oxidase, que é composta de pela NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX 5, DUOX1 e DUOX2. Estas enzimas têm a capacidade de transportar elétrons através da membrana plasmática e gerar ânions superóxidos. A NOX 4 é mais expressa em células endoteliais (Koh *et al.*, 2009).

As EROs derivadas da NOX, têm sido implicadas em uma variedade de doenças vasculares, incluindo a hipertensão. Estes radicais livres derivados da NOX podem ser produzidos em resposta a Angiotensina II (Cai, 2005; Koh *et al.*, 2009). As subunidades da NADPH oxidases estão expressas em várias células, como as endoteliais, do músculo liso vascular, neutrófilos e fibroblastos. A



## Introdução

subunidade gp91phox é mais expressada em fagócitos, enquanto as outras subunidades são expressas em vários tecidos e estão relacionadas com crescimento celular (Griendling & Ushio-Fukai, 2000).

A atividade vascular da NADPH oxidase é regulada pelas citocinas, hormônios e forças mecânicas. Além disso, angiotensina II, trombina, fator agregação plaquetária, fator crescimento tumoral (TGF- $\beta$ ) e os metabólitos do ácido araquidônico estão relacionadas com aumento da atividade desta enzima e consequentemente com a produção de radicais livres (Cai *et al.*, 2000; Griendling *et al.*, 2000). Estudos prévios demonstram que angiotensina II estimula a produção de radicais livres através da enzima NADPH do citocromo P-450 oxiredutase (Rajagopalan *et al.*, 1996; Griedling & Ushio-Fukai, 1994; McIntyre *et al.*, 1999).

Soma-se a formação de EROs a Xantina oxidase, que utiliza a xantina, hipoxantina ou NADH na geração de radicais livres. Em células endoteliais, a atividade e expressão da xantina oxidase são aumentadas pelo interferon  $\gamma$  (Cai *et al.*, 2000). A NOS e suas isoformas também podem atuar como fonte de EROs. Na ausência, ou em baixas concentrações de seu substrato L-arginina ou do co-fator BH<sub>4</sub> a NOS pode sofrer um desacoplamento, promovendo a formação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (McIntyre *et al.*, 1999; Kawashima & Yokoyama, 2003; Taniyama & Griendling, 2003). Outra fonte de EROs são as mieloperoxidases (MPO), que além de produzir radicais livres, utilizam o NO em suas reações, diminuindo a biodisponibilidade do mesmo e produzindo espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Taniyama & Griendling, 2003).

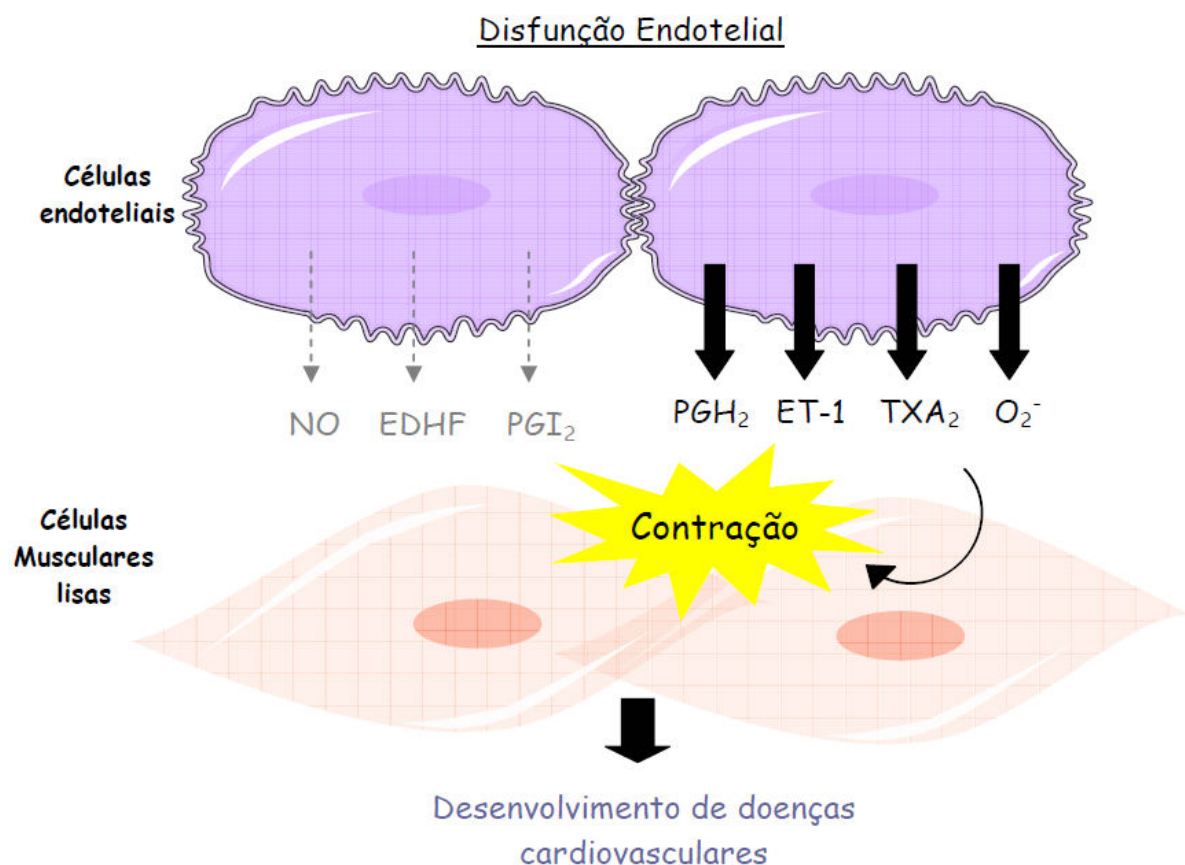
Dentre principais enzimas antioxidantes vasculares podemos citar: a catalase, a glutational peroxidase (GPX), a tioredoxina redutase e as superóxido dismutases (SODs). A glutational peroxidase e a catalase são as enzimas envolvidas na degradação do peróxido de hidrogênio. A catalase transforma a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. Já a glutational peroxidase transforma o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água (Griendling & Ushio-Fukai, 2000). Outra enzima antioxidante é a família das superóxido dismutases (SODs). Esta família cataliza a reação do O<sub>2</sub><sup>-</sup> com um elétron e dois prótons formando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Três isoformas da SOD foram identificadas, a SOD cobre/zinco (Cu/Zn SOD; SOD1), SOD mitocondrial (Mn SOD; SOD2) e a SOD extracelular (ECSOD; SOD3). A ECSOD é uma glicoproteína, produzida em fibroblastos e células gliais, sendo a isoforma mais

## Introdução

encontrada em vasos (McIntyre *et al.*, 1999). Em suma, a redução da atividade das enzimas antioxidantes resulta em aumento da formação de EROs, levando à ações danosas aos vasos (Touyz & Schinffrin, 2004).

Muitas funções do endotélio e do músculo liso vascular são afetadas pelas EROs. No endotélio vascular os radicais livres podem causar diminuição da biodisponibilidade de NO, apoptose, aumento adesão de monócitos e angiogênese. Enquanto no MLV, os radicais livres podem promover crescimento celular, migração de mediadores inflamatórios, desorganização da matriz extracelular e aumento do tônus muscular (Taniyama & Griending, 2003). Todas estas características contribuem para injúria vascular, disfunção endotelial e consequentemente para a fisiopatologia da hipertensão arterial (Griending & Ushio-Fukai, 1994; Kerr *et al.*, 1999; Cruzado *et al.*, 2005; Touyz & Schinffrin, 2004; 2008). Alguns metais, como o chumbo, podem participar da reação de Fenton causando aumento da produção de radicais livres (Cai, 2005). Estudos prévios demonstram a capacidade do chumbo em gerar EROs, e estes dados estão associados com a hipertensão (Vaziri *et al.*, 1997; 1999; Farmand *et al.*, 2005).

O desequilíbrio na produção dos fatores vasodilatadores e vasoconstrictores derivados do endotélio promovem alterações na função endotelial e aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O termo disfunção endotelial refere-se à redução da produção e/ou biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras, em especial do NO ou o aumento de substâncias vasoconstritoras (Figura 3) (Cannon III, 1998; Triggle, 2003).



**Figura 3:** A disfunção endotelial: Alteração considerada precursora das doenças cardiovasculares e caracterizada pela redução da liberação dos mediadores vasodilatadores. As flechas pontilhadas indicam diminuição da secreção, enquanto as flechas espessas indicam aumento da secreção. (modificado de Rattmann, 2009).

Estudos prévios demonstram que a exposição crônica ao chumbo promove disfunção endotelial em humanos (Ni *et al.*, 2004) e em modelos experimentais (Marques *et al.*, 2001; Heydari *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2010).

## Introdução

### 1.5 JUSTIFICATIVA

A revisão literária desenvolvida acima mostra que a exposição humana ao chumbo ocorre principalmente através da fundição primária desse metal, reciclagem de baterias, indústrias de pigmentos, setor eletro-eletrônico (solda e ligas), exposição ocupacional e a contaminação do ar, água potável e alimentos (áreas contaminadas). Dessa forma, os indivíduos estão expostos continuamente a baixas concentrações de chumbo e pouco se sabe sobre seus efeitos no organismo nos primeiros estágios de exposição.

A Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) recomenda segura uma concentração sanguínea de chumbo no limite de 60 µg/dL em adultos ocupacionalmente expostos. No Brasil, o Ministério do Trabalho (1988), através da NR7, considera que os valores de referência de normalidade (valor próximo de ser encontrado em uma população não-exposta ocupacionalmente) e o Índice Biológico Máximo Permitido são respectivamente 40 µg/dL e 60 µg/dL. A maioria dos estudos descritos na comunidade científica avalia o efeito tóxico do chumbo em concentrações próximas às recomendadas pelo Ministério do Trabalho, todavia, pouca atenção tem sido dada às ações deste metal em concentrações menores e em fases iniciais do tratamento. Por isso, o objetivo do presente estudo foi investigar, em uma fase inicial de exposição, os efeitos de baixa concentração de acetato de chumbo sobre o sistema cardiovascular, especialmente se sob essas condições já poderia ser verificada alguma alteração pressórica e disfunção endotelial, como as descritas na literatura através da exposição crônica ao metal. Para isto, ratos foram tratados por sete dias com baixa concentração de chumbo, a PAS indireta foi mensurada e a aorta foi utilizada para investigar os possíveis danos vasculares desse metal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento de sete dias com acetato de chumbo em baixas concentrações e em fases iniciais do tratamento sobre a pressão arterial e a reatividade vascular em segmentos isolados de aorta torácica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o efeito do acetato de chumbo, em baixa concentração e nas fases iniciais de exposição (sete dias), sobre a medida indireta da pressão arterial sistólica de ratos acordados.

Verificar se o tratamento por sete dias com acetato de chumbo promove alteração na reatividade vascular à fenilefrina;

Avaliar se o chumbo altera a participação endotelial na resposta vascular à fenilefrina;

Verificar se o chumbo altera o relaxamento vascular dependente e independente do endotélio;

Estudar participação do óxido nítrico, da isoforma induzível de NO, das espécies reativas do oxigênio, do sistema renina angiotensina, do fator de relaxamento derivado do endotélio e dos prostanóides derivados da COX na reatividade vascular à fenilefrina.

Analisar se o tratamento de sete dias com acetato de chumbo altera a atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina e a produção de ânion superóxido;

Avaliar se a exposição ao chumbo altera a expressão proteica da isoforma endotelial de óxido nítrico, isoforma fosforilada endotelial da sintase do óxido nítrico (resíduo Ser<sup>1177</sup>), isoforma induzível da sintase do óxido nítrico, do receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos com aproximadamente três meses de idade, pesando entre 250 e 300 g, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Tais animais foram mantidos em gaiolas sob condições de controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM- CEUA 004/2007).

##### 3.1.1 Modelo Experimental

Os ratos foram divididos de forma aleatória em dois grupos experimentais: Controle e Chumbo. Os animais do grupo Chumbo receberam diariamente, durante sete dias, injeções intramusculares (im.) de acetato de chumbo na face interna das patas traseiras, sendo a primeira dose de 4 µg/ 100g e as doses subseqüentes de 0,05 µg/ 100g/dia. Esta quantidade de chumbo, diluída em um volume de 20 mL/100g de rato, corresponde ao líquido extracelular, que é de 20% do peso corporal do animal. Assim, espera-se que a concentração sanguínea de chumbo possa atingir aproximadamente 20 µg/dL. Os animais do grupo Controle receberam diariamente injeção im. nas patas traseiras, de solução salina durante os sete dias de tratamento.

## Materiais e métodos

### 3.1.2.1 Concentração sanguínea do chumbo

A concentração sanguínea do chumbo foi determinada de acordo com Sysalová, (1997). Ao final do tratamento, amostras heparinizadas, dos grupos Chumbo e Controle, foram medidas em duplicata por um espectrofotômetro de absorção atômica (modelo: AAS5 EA com forno de grafite, Carl Zeiss, Alemanha) no Centro de Ciências Exatas – Departamento de Química (Universidade Federal do Espírito Santo).

## 3. 2 ANÁLISE DA MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada de acordo com Buñag (1973) e modificada segundo Grizzo *et al.* (2008). As medidas foram realizadas nos animais dos grupos Controle e Chumbo semanalmente (no tempo zero e após sete dias), através de um pletismógrafo de cauda (IITC Life Science– 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA). Os animais foram previamente climatizados, durante três dias antes da mensuração, para adaptarem-se ao pletismógrafo, e desta forma, prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento. A média de três medidas foi utilizada.

## 3.3. METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA

Os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (Amental<sup>®</sup>) na dose de 50 mg/kg intraperitoneal e, em seguida, eutanaziados e exanguinados. A aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-modificado, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17;

## Materiais e métodos

$\text{NaHCO}_3$  24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$ . Esta solução foi mantida com pH 7,4.

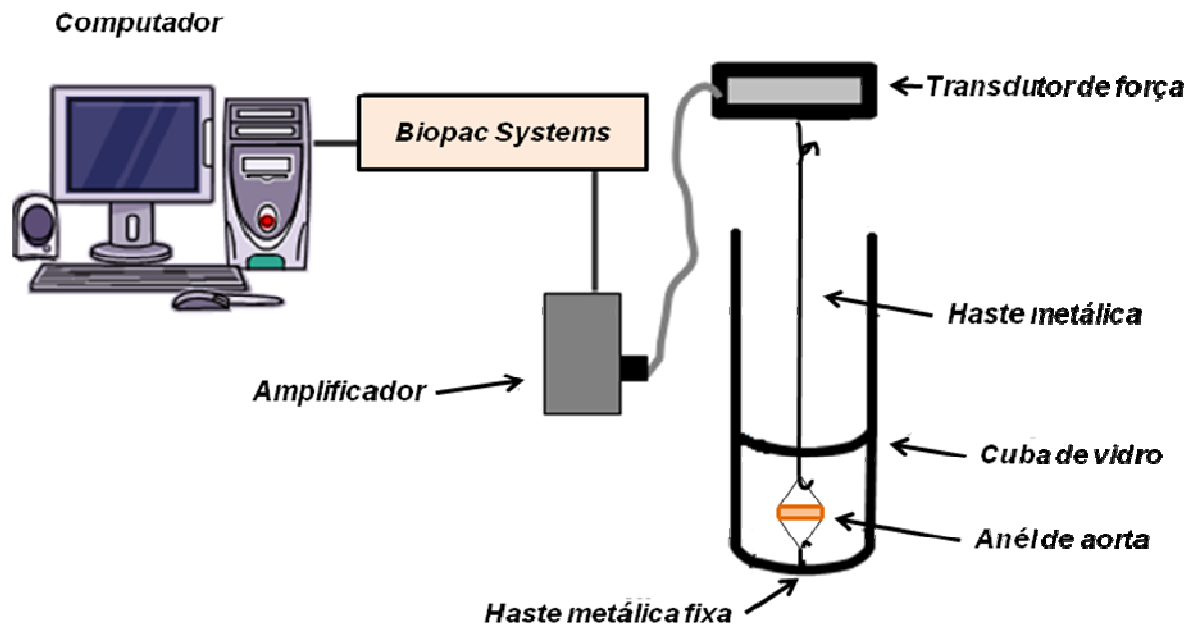
Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seis segmentos cilíndricos de aproximadamente 3,5 a 4 mm de comprimento (Figura 4).



**Figura 4:** (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4mm (Angeli, 2009).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a  $36 \pm 0,5$  °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que fiquem paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA- USA) e este a um computador (Figura 5).





**Figura 5:** Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular *in vitro*. Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems* (modificado de Dias, 2007).

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,9 a 1,3 gramas, reajustada, quando necessário, durante 45 minutos de estabilização (Figura 6 A).

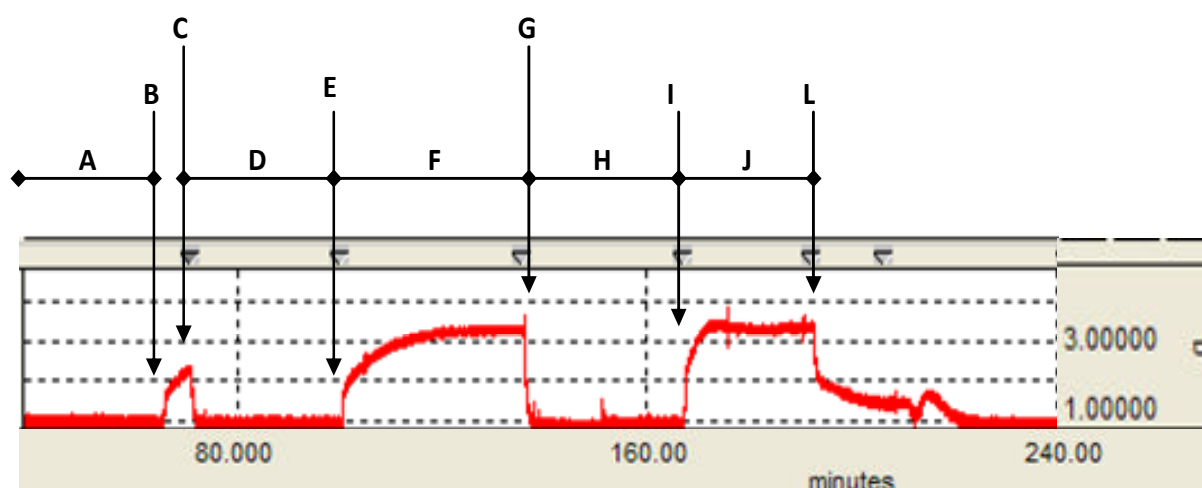
### 3.3.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho KCl 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados aproximadamente três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso (Figura 6 B, C). Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura 6 D), uma nova dose de KCl (75 mM) era adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida no período de aproximadamente 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 6 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal (0,9 a 1,3

gramas) e, depois de 30 minutos (Figura 6 G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

### 3.3.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina  $10^{-6}$  M. Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina ( $10^{-5}$  M) foi aplicada (Figura 6 I, J, L). Os anéis que relaxaram menos que 80% do platô eram descartados. Os anéis sem endotélio relaxaram no máximo 10% ou até contraíram.



**Figura 6:** Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina (Fe)  $10^{-6}$  M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh)  $10^{-5}$  M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (modificado de Dias, 2007).

### 3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### **3.4.1 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina**

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritora do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse restabelecida. Após 30 minutos de estabilização e mais 30 minutos de incubação com fármacos, era realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) de maneira cumulativa nos dois grupos estudados.

#### **3.4.2 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina**

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro ( $E^+$ ) e sem endotélio ( $E^-$ ). As células endoteliais foram removidas mecanicamente através do uso de fios metálicos. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina  $10^{-5}$  M induzir o relaxamento, após a pré-contracção com fenilefrina. A preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentrações-resposta à fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M).

#### **3.4.3 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na resposta de relaxamento dependente do endotélio**

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis de aorta com endotélio

## Materiais e métodos

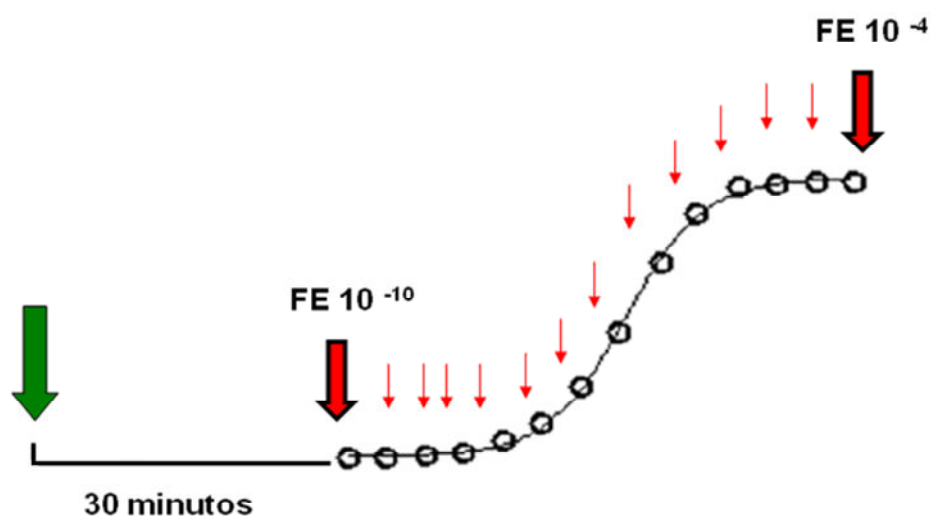
foram pré-contraídos com fenilefrina  $10^{-6}$  M. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina ( $10^{-11}$  a  $3 \cdot 10^{-4}$  M).

### **3.4.4 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na resposta de relaxamento independente do endotélio**

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Assim como para acetilcolina, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina  $10^{-6}$  M e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta a esse agonista em concentrações de  $10^{-11}$  a  $3 \cdot 10^{-4}$  M.

### **3.4.5 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta à fenilefrina na aorta**

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da mesma forma. Após o teste do endotélio e dos 30 minutos de estabilização da preparação, o fármaco a ser estudado era incubado por trinta minutos, e, logo após, realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $3 \cdot 10^{-4}$  M) (Figura 7).



**Figura 7:** Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) (Angeli, 2009).

#### 3.4.5.1 Influência do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na via do óxido nítrico

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100  $\mu$ M).

#### 3.4.5.2 Influência do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na isoforma induzível de óxido nítrico (iNOS)

Com a finalidade de estudar a participação da iNOS na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não seletivo dessa enzima, a Aminoguanidina (50  $\mu$ M).

## Materiais e métodos

### 3.4.5.3 Influência do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre os canais para $K^+$

Com a finalidade de estudar a participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, os anéis foram incubados com tetraetilamônio (TEA) (2,0 mM), um inibidor não específico dos canais para  $K^+$ .

### 3.4.5.4 Envolvimento da Angiotensina II local sobre o tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Buscando averiguar uma possível participação da via da angiotensina II local sobre o tratamento de sete dias com acetato de chumbo na reatividade vascular à fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M), foi utilizado o enalapril (10  $\mu$ M), um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA).

Em seguida, mediante outro protocolo, foi avaliada a participação da ativação dos receptores  $AT_1$  pela angiotensina II através do bloqueio farmacológico destes receptores com o losartan (10  $\mu$ M).

### 3.4.5.5 Envolvimento de radicais livres no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Para verificar o envolvimento de EROs sobre o tratamento por sete dias na resposta contrátil à fenilefrina foram utilizados: a apocinina (Apo, 100  $\mu$ M), um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, ou seja, inibe uma das principais enzimas formadoras de radicais livres; a superóxido dismutase (SOD, 150 U  $ml^{-1}$ ), é um importante anti-oxidante fisiológico que converte ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); e a catalase (1000 U/ml), um “varredor” de  $H_2O_2$ .

## Materiais e métodos

### 3.4.5.6 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre o tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Com a finalidade de estudar a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, os anéis isolados de aorta foram incubados com indometacina (10  $\mu$ M), um inibidor não específico da enzima ciclooxigenase (COX).

Para confirmar a participação dos prostanóides derivados da COX, anulando um possível efeito do NO, os anéis isolados de aorta foram incubados com indometacina (10  $\mu$ M) e com L-NAME (100 $\mu$ M).

Foi calculada a diferença das áreas abaixo da curva de fenilefrina em relação à situação controle para analisar o envolvimento dos prostanóides derivados da COX sobre o efeito do tratamento de sete dias com acetato de chumbo na resposta contrátil à fenilefrina.

## 3.5 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTÉICA

### 3.5.1 Western Blot para detecção da eNOS, p-eNOS, iNOS , e receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> em aorta de ratos

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência da exposição de sete dias ao chumbo sobre a expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS), da isoforma endotelial fosforilada da sintase de óxido nítrico (p-eNOS), isoforma induzível de óxido nítrico (iNOS) e dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Chumbo. A expressão protéica de todas as proteínas foi realizada em condições basais (segmentos retirados logo depois do animal ser sacrificado).

### 3.5.2 Preparação do tecido e quantificação das proteínas

As amostras foram preparadas utilizando segmentos de aorta torácica de ambos os grupos. Os anéis da aorta eram congelados com nitrogênio líquido e mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento em que foram utilizados. A homogeneização dos segmentos arteriais congelados foi realizada com homogeneizador de vidro contendo uma solução de Tris HCl 50 mM, NaCl 0,9 M, pH:7,4. Depois de homogeneizadas as amostras eram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 10 minutos , 6.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, o sobrenadante era retirado e feita então a quantificação protéica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 50  $\mu\text{g}$  de proteína, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39  $\mu\text{M}$  de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%). As amostras depois de preparadas eram aquecidas a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 4 minutos. Para p-eNOS, as amostras não foram aquecidas.

### 3.5.3 Eletroforese e transferência das amostras

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 7,5% e 10% para eNOS, p-eNOS, iNOS, receptor  $\text{AT}_1$  e  $\text{AT}_2$  (1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em um tampão para eletroforese (25mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma corrente constante de 80V por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPac<sup>TM</sup> HC, BioRad, Singapura). Para p-eNOS, a cuba de eletroforese foi imersa no gelo. Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (Amersham, UK) previamente ativada por água durante 20 segundos. Para a transferência, o gel, a membrana, o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche banhados por uma solução tampão de transferência (Tris



## Materiais e métodos

25mM, glicina 190mM, SDS 0.1% e Metanol 20%) à temperatura ambiente usando um *semi-dry* (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) com uma corrente de 25 V por 1 hora.

### 3.5.4 Incubação com Anticorpos

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução bloqueante (leite desnatado 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas eram incubadas durante toda a noite à 4 °C, sob agitação, em solução à 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) adicionados aos anticorpos primários para eNOS (1:250 – Transduction Laboratories KY), p-eNOS (1:250–Transduction Laboratories KY), iNOS (1:250 - transduction Laboratories KY), AT<sub>1</sub> (1:500, Sigma Chemical, CO, St Louis USA), AT<sub>2</sub> (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, USA) e  $\alpha$ -actina (1:5000, Sigma Chemical, CO, St Louis USA).

Depois disto, as membranas eram lavadas, sob agitação, com solução TBS-T durante 30 minutos para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 5 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário, Imunoglobulina IgG anti-camundongo para a eNOS, p-eNOS iNOS e  $\alpha$  actina (1:5000, Sigma Chemical, CO, St Louis USA), Imunoglobulina IgG anti-coelho para o receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, USA ).

### 3.5.5 Detecção das Proteínas

As proteínas correspondentes a eNOS, p-eNOS, iNOS, receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> e  $\alpha$ -actina foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a um sistema de detecção (ELC

## Materiais e métodos

Plus, Amersham™ GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas eram colocadas em contato com filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham™, UK), sendo as bandas impregnadas e posteriormente reveladas.

A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isto, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram escaneadas. O programa Image J foi utilizado para analisar as bandas.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) PLASMÁTICA

A atividade da ECA foi medida pelo método Fluorimétrico de acordo com Oliveira *et al* (2000). As amostras de plasma em triplicata (3µL) foram incubadas por 15 minutos a uma temperatura de 37°C com 40µL de “buffer” contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Sigma Chemical) diluído em tampão borato de sódio e NaCl 0,9M, pH 8,3. A reação foi cessada pela adição de 190 µL de 0,34 M NaOH. O produto gerado, His-Leu, foi mensurado fluorimetricamente (Synerg 2, Biotek, U.S.A) antecedido por 10 minutos de incubação com 17 µL de 2% *O-phthal-dialdehyde* (OPA) em metanol. As medidas de fluorescência foram realizadas a 37°C em uma placa de leitura negra com 96 cavidades (Black Polystyrene Corning, U.S.A) com filtros de excitação de 365 nm de emissão de 495 nm. A placa de fluorescência foi controlada pelo software Gen 5. Uma curva de calibração com substrato da ECA foi incluída em cada placa.

### 3.7 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) “IN SITU”.

#### 3.7.1 Quimioluminescência dependente de lucigenina (QL<sub>Luc</sub>).

Para verificar a influência da exposição por sete dias ao acetato de chumbo sobre a produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> foi utilizada a técnica de quimioluminescência

dependente de lucigenina ( $QL_{Luc}$ ) (Skatchkov et al., 1999). A Lucigenina é oxidada pelo ânion superóxido (emitindo luminescência). Esta reação luminosa entre o  $O_2^-$  e a lucigenina foi detectada por um luminômetro (Synerg 2, Biotek, U.S.A).

O experimento foi realizado em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Chumbo. Os anéis foram incubados com uma solução Krebs HEPES (Para 100 ml de Krebs: 29,4 mg de  $CaCl_2$ , 759 mg de NaCl, 41,7 mg de KCl, 4,9 mg de  $MgCl_2$ , 197,8 mg de HEPES e 198,2 de glicose) em banho à 37°C por 30 minutos.

Inicialmente foi realizada uma leitura basal somente com lucigenina, posteriormente os anéis da aorta foram depositados nos poços de uma placa de leitura com 96 cavidades (Black Polystyrene Corning, U.S.A). Os valores foram obtidos a partir da subtração do valor basal (medida do HEPES mais lucigenina) pelo valor obtido com o tecido (HEPES mais aorta) em uma média de 10 medidas consecutivas e com tempo de integração de 30 segundos. Posteriormente, uma concentração (10 mmol/L) de Tiron (varredor de ânion superóxido não enzimático e permeável a membrana celular) foi adicionada para confirmar se a luminescência observada era dependente especificamente do ânion superóxido. Após estas medidas os anéis foram secos em uma estufa à 40°C por 24 horas para obtenção do peso seco. A produção local de ânion superóxido foi expressa em unidades arbitrárias de luminescência/mg de tecido/minuto.

### 3.7.2 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE).

Outra técnica utilizada para verificar a influência da exposição ao acetato de chumbo sobre a produção de  $O_2^-$  foi a fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE). O DHE é um derivado do etídio que entra em contato com  $O_2^-$  oxida-se e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha. Este método permite analisar a produção “*in situ*” nos segmentos arteriais. Os segmentos de aorta foram retirados dos animais, em seguida, limpos e mantidos por 1 hora em solução Krebs-Henseleit com sacarose 30%. Posteriormente, estes segmentos foram congelados em meio adequado (meio de

## Materiais e métodos

congelamento). Assim, as amostras foram mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o dia do experimento.

Os segmentos de aorta foram cortados no criostato em anéis com  $10\text{ }\mu\text{m}$  de espessura. Posteriormente estes anéis foram recolhidos em lâminas gelatinadas e secos em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Após este procedimento, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e posteriormente incubadas com Krebs HEPES (Para 100 ml de Krebs: 29,4 mg de  $\text{CaCl}_2$ , 759 mg de NaCl, 41,7 mg de KCl, 4,9 mg de  $\text{MgCl}_2$ , 197,8 mg de HEPES e 198,2 de glicose) por 30 minutos em uma câmara úmida à  $37^{\circ}\text{C}$ . Decorridos os 30 minutos, o Krebs foi escoado e o excesso seco. Em seguida, foi realizada incubação com dihidroetídio (DHE)  $2\text{ }\mu\text{m}$  por duas horas na estufa com câmara fechada a  $37^{\circ}\text{C}$ . A luminescência emitida foi visualizada com microscópio fluorescência invertido (NIKON eclipse Ti-S) e câmara fotográfica (NIKON digital sigth DS-U<sub>2</sub>) com filtro de fluorescência para DHE (verde). O etídeo unido ao núcleo das células foi visualizado com  $\lambda_{\text{exc}} = 546\text{ nm}$  e detectado com  $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}700\text{ nm}$ . As imagens foram quantificadas pelo programa NISS Element - BR.

### 3.8 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental.

As respostas contráteis ao KCl e à fenilefrina foram expressadas como tensão desenvolvida pelo anel de aorta, em gramas de contração. As respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio, evocadas pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente, foram expressas em porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração obtida pela fenilefrina.

Para a determinação dos valores de resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e  $\text{pD}_2$  ( $-\log \text{EC}_{50}$ , que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina que produz 50% da resposta máxima), em resposta aos diferentes agonistas utilizados, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das

## Materiais e métodos

curvas concentração-resposta utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina dos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina. A dAUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC%) da curva controle correspondente.

Os resultados da expressão protéica da eNOS, iNOS e receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> estão expressos como relação entre a densidade óptica para estas proteínas em relação a  $\alpha$  actina. Já os resultados da expressão protéica da p-eNOS estão expressos como a razão entre p-eNOS/eNOS.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* de *Student* não-pareado, análise de variância (ANOVA), de duas vias para medidas repetidas ou completamente randomizada. Quando ANOVA apresentava significância estatística era realizado o *pos-hoc* de Bonferroni utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de  $p < 0,05$ .

### 3.9 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- Acetato de Chumbo
- Acetato de sódio (Sigma)
- Acetilcolina, Cloridrato (Sigma)
- Ácido acético glacial (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido bórico (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Ácido hidroxietilpiperazina (HEPES) (Sigma)
- Ácido orto-fosfórico(Sigma)

## Materiais e métodos

- Albumina bovina (Sigma)
- Aminoguanidina (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para alfa actina (Sigma)
- Anticorpo produzido em coelho para AT<sub>1</sub> (Sigma)
- Anticorpo produzido em coelho para AT<sub>2</sub> (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para eNOS (Transduction Laboratories)
- Anticorpo produzido em camundongo para iNOS (Transduction Laboratories)
- Anticorpo produzido em camundongo para peNOS (Transduction Laboratories)
- Apocinina (Acetovanilona) (Sigma)
- Azul brilhante de Coomassie (Sigma)
- Azul de Bromofenol (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Bromophenol Blue (Sigma)
- Catalase (Sigma)
- Cloreto de cálcio dihidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Dihidroetidio (Sigma)
- Dodecil sulfato de sódio (Sigma)
- Enalapril (Sigma)
- Etanol absoluto (Sigma)
- Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Fosfato de Potássio Monobásico (Merck)
- Glicerol (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Hidróxido de sódio (Sigma)

## Materiais e métodos

- Hip-His-Leu (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- Leite desnatado (Nestlé)
- L-Fenilefrina, Hidrocloridrato (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- Lucigenina (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- N,N, N',N'- Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
- N<sup>□</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Nitroprussiato de sódio, dihidratado (Fluka)
- o-phataldialdeído (OPA) (Sigma)
- Ouabaína, octahidrato (Sigma)
- Persulfato de amônio (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham)
- Superóxido Dismutase de eritrócito bovino (SOD) (Sigma)
- Tetraetilamonio (TEA) (Sigma)
- Tiopental Sódico (Amental<sup>®</sup>)
- Tris HCl (Sigma)

Todas as soluções, com exceção da indometacina, foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a -20° C. A indometacina foi diluída em tampão Tris 0.1M.

## 4 RESULTADOS

### 4.1. CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO NO SANGUE

A medida da concentração sanguínea de chumbo foi realizada após sete dias de exposição ao metal. Os animais do grupo Chumbo apresentaram concentrações sanguíneas de  $9,98 \mu\text{g/dL} \pm 1,70 \mu\text{g/dL}$  ( $n=5$ ) enquanto os animais do grupo Controle ( $n= 5$ ) apresentaram concentrações menores que o limite de detecção do aparelho ( $<LD$ ).

### 4.2 VALORES DE MASSA CORPORAL

Os animais dos grupos Controle e Chumbo apresentaram peso semelhante no início e ao fim do tratamento sugerindo que a exposição por sete dias ao acetato de chumbo não influenciou no ganho de peso corporal (Tabela 1).

**Tabela 1:** Valores Médios do peso corporal (g) no início e ao término da exposição por sete dias ao acetato de chumbo.

	Peso Corporal Inicial (g)	Peso Corporal Final(g)
CT E <sup>+</sup> (n= 29)	$261,1 \pm 1,39$	$308,3 \pm 3,35$
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup> (n= 30)	$258 \pm 0,98$	$313,0 \pm 3,14$

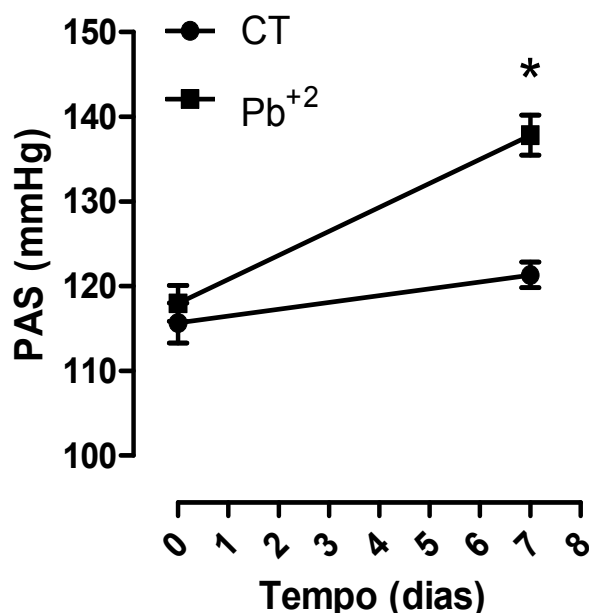
Valores expressos em média e EPM; Teste t não-pareado.  $p > 0,05$ .



## Resultados

### 4.3. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)

Nos animais dos grupos Controle e Chumbo a PAS foi avaliada no tempo 0 (antes de iniciar o tratamento) e sete dias após o tratamento. No tempo 0, os animais apresentavam valores pressóricos semelhantes (CT,  $n=12$ ,  $115 \pm 2,37$  mmHg vs  $Pb^{+2}$ ,  $n=12$ ,  $118 \pm 2,12$  mmHg,  $p>0,05$ ). Ao final do tratamento os grupos Controle e Chumbo apresentaram níveis pressóricos diferentes (CT,  $n=12$ ,  $121 \pm 1,50$  mmHg vs  $Pb^{+2}$ ,  $n=12$ ,  $137 \pm 2,36$  mmHg. ANOVA (duas vias),  $*p<0,05$ ) (Figura 8).



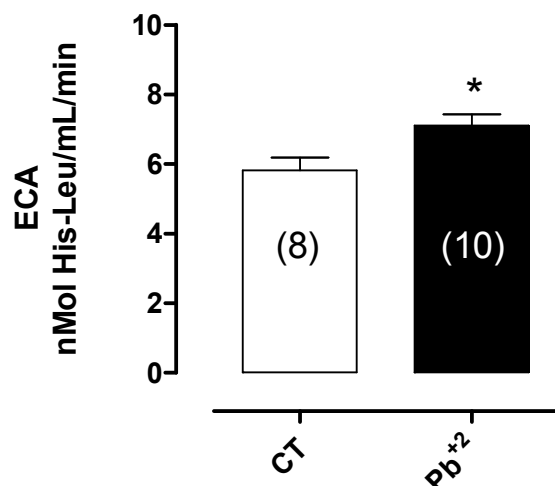
**Figura 8:** Análise dos valores de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medidos por meio de da pletismografia de cauda em ratos do grupo Controle e Chumbo, durante duas semanas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. ANOVA (duas vias),  $*p < 0,05$  (CT=  $121 \pm 1,50$  mmHg,  $n=10$  vs  $Pb^{+2}= 137 \pm 2,36$  mmHg,  $n=10$ ).

### 4.4. ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) PLASMÁTICA

A atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi significativamente maior no plasma dos animais expostos por sete dias ao

## Resultados

tratamento com acetato de chumbo quando comparados aos animais controle (CT=  $5,82 \pm 0,35$ , n=8; Pb<sup>+2</sup>=  $7,11 \pm 0,31$ , n=10), (Figura 9).

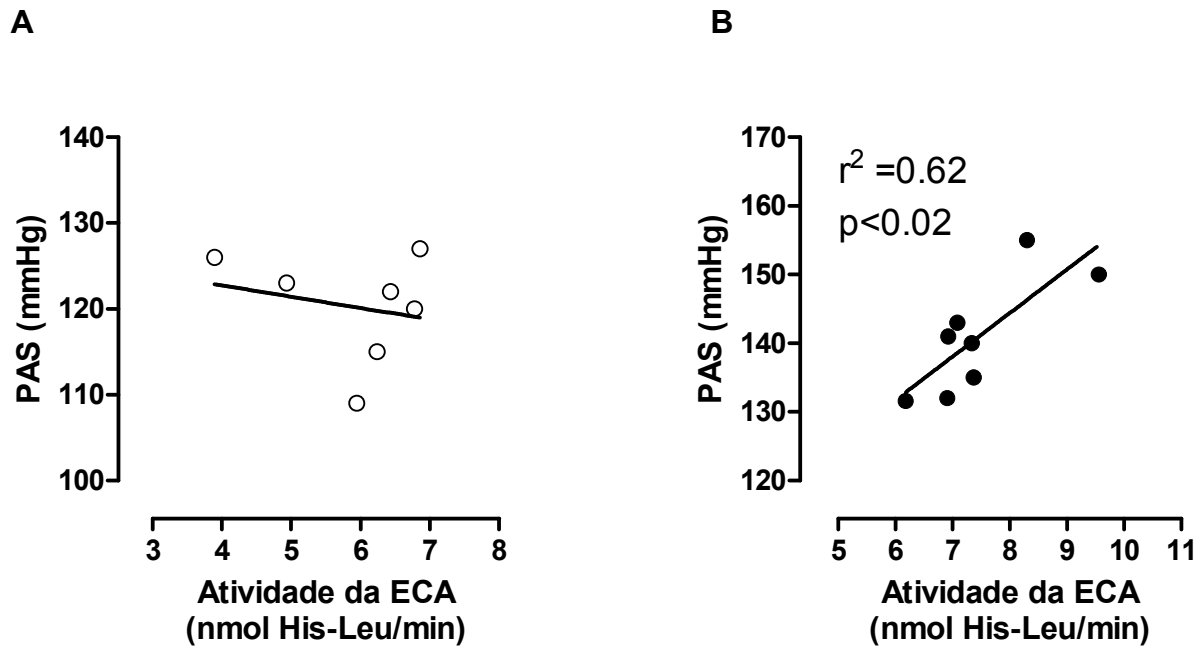


**Figura 9:** Atividade da ECA (nMol His-Leu/mL/min) no plasma de ratos dos grupos Controle e Chumbo. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t \*p<0,05 CT vs Pb<sup>+2</sup>.

### 4.4.1 Correlação entre a atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina (ECA) e a pressão arterial sistólica (PAS).

A correlação entre a atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina (ECA) e a pressão arterial sistólica (PAS) foi significativa somente nos animais expostos por sete dias ao tratamento com acetato de chumbo (CT,  $r^2 = 0,05$ ,  $p > 0,05$  n= 8; Pb<sup>+2</sup>  $r^2 = 0,62$ ,  $p < 0,02$  n= 8 ) (Figura 10 A e B).

## Resultados



**Figura 10:** Correlação entre a atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina (ECA) (nMol) e a pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg) em ratos controle (A) e tratados por sete dias com acetato de chumbo (B).

#### 4.5 RESPOSTAS VASCULARES AO CLORETO DE POTÁSSIO (KCl) EM ARTÉRIA AORTA

A exposição dos segmentos arteriais ao KCl (75mM) promoveu resposta contrátil com magnitude semelhante nos dois grupos experimentais. A retirada mecânica do endotélio não mudou de forma significativa a resposta contrátil ao KCl, e assim como nos segmentos com endotélio íntegro a resposta ao KCl nos anéis sem endotélio foi semelhante nos dois grupos experimentais.

O número de animais mostrados nas tabelas 2 e 3 representam o *n* total dos animais utilizados em todos os protocolos experimentais submetidos à resposta contrátil ao cloreto de Potássio (KCl).

## Resultados

**Tabela 2:** Valores de resposta contrátil ao Cloreto de Potássio (KCl) em anéis isolados de aorta, com endotélio de ratos Wistar dos grupos: Controle (CT E<sup>+</sup>) e Chumbo (Pb<sup>+2</sup>).

Contração (g) KCl (75mM)	
CT E <sup>+</sup>	3,48 ± 0,08 (n= 29)
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup>	3,13 ± 0,09 (n= 30)

Valores expressos em média e EPM; Teste t não-pareado. p > 0,05.

**Tabela 3:** Valores de resposta contrátil ao Cloreto de Potássio (KCl) em anéis isolados de aorta desnudos de ratos Wistar dos grupos: Controle (CT E<sup>-</sup>) e Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>-</sup>).

Contração (g) KCl (75mM)	
CT E <sup>-</sup>	3,37 ± 0,15 (n= 10)
Pb <sup>+2</sup> E <sup>-</sup>	3,38 ± 0,12 (n= 12)

Valores expressos em média e EPM; Teste t não-pareado. p > 0,05.

#### 4.6 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS.

A fenilefrina (agonista  $\alpha_1$  adrenérgico) promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de aorta de animais dos grupos Controle e Chumbo (Figura 11). No entanto, a resposta máxima foi menor nos segmentos arteriais dos animais do grupo Chumbo (Tabela 4). Não houve diferença significativa entre os grupos Controle e Chumbo na sensibilidade (pD<sub>2</sub>).

## Resultados

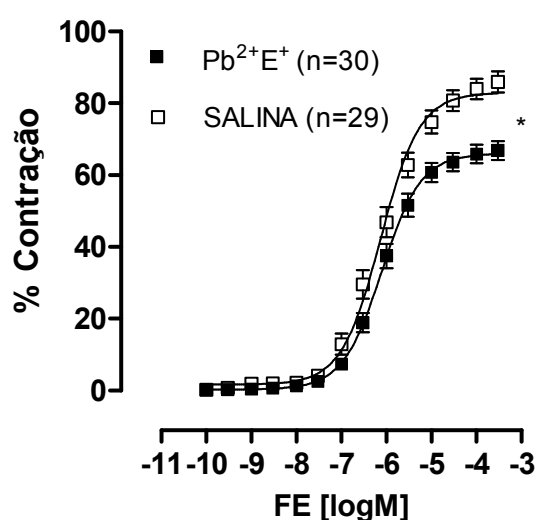
A resposta à fenilefrina foi expressa em porcentagem da contração máxima induzida pelo KCl.

O número de animais mostrado na Figura 8 é maior do que as outras figuras, pois representa o  $n$  total dos animais utilizados em todos os protocolos experimentais submetidos à curva cumulativa de fenilefrina. Portanto, para cada protocolo de reatividade vascular realizado com fármaco a ser estudado, era realizado ao mesmo tempo, um anel de aorta do grupo Controle ou um anel de aorta do grupo Chumbo sem o fármaco.

**Tabela 4:** Valores de resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ , g) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas intactos de ratos Wistar dos grupos Controle ( $CT E^+$ ) e Chumbo ( $Pb^{+2} E^+$ ).

	$R_{\text{máx}}$ (g)	$pD_2$
$CT E^+$	$86,00 \pm 2,57$	$6,14 \pm 0,12$
$Pb^{+2} E^+$	$67,70 \pm 2,97^*$	$6,06 \pm 0,08$

Valores expressos em média  $\pm$  EPM; Teste  $t$  não-pareado. \* $p < 0,05$ ;  $R_{\text{máx}}$ :  $CT E^+$  vs  $Pb^{+2} E^+$



**Figura 11:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos Controle ( $CT E^+$ ) e Chumbo ( $Pb^{+2} E^+$ ). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste  $t$  não-pareado. \* $p < 0,05$  para  $R_{\text{máx}}$ :  $CT E^+$  vs  $Pb^{+2} E^+$ .

## Resultados

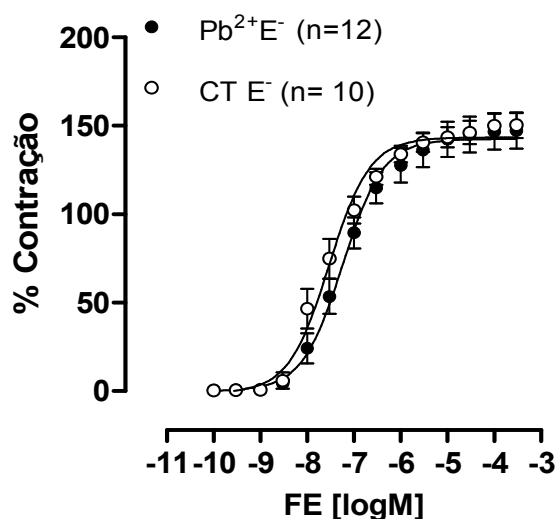
## 4.7 MODULAÇÃO ENDOTELIAL DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS.

A remoção mecânica do endotélio aumentou a resposta contrátil à fenilefrina nos dois grupos estudados, porém não apresentou alteração da  $R_{máx}$  e da  $pD_2$  após o tratamento de sete com acetato de chumbo quando comparado ao grupo Controle (Tabela 5; Figura 12).

**Tabela 5:** Valores de resposta máxima ( $R_{máx}$ , g) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas sem endotélio de ratos Wistar dos grupos Controle ( $CT E^-$ ) e na Chumbo ( $Pb^{+2} E^-$ ).

	$R_{máx}$ (g)	$pD_2$
$CT E^-$	$150,4 \pm 7,32$	$7,65 \pm 0,14$
$Pb^{+2} E^-$	$152,1 \pm 10,43$	$7,37 \pm 0,10$

Valores expressos em média  $\pm$  EPM; Teste  $t$  não-pareado.  $p > 0,05$ ;  $R_{máx}$ :  $CT E^-$  vs  $Pb^{+2} E^-$



**Figura 12:** Efeito da remoção do endotélio ( $E^-$ ) na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle ( $CT E^-$ ) e Chumbo ( $Pb^{+2} E^-$ ). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste  $t$  não-pareado. A análise foi realizada através do Teste  $t$  não pareado para comparações de  $R_{max}$  e  $pD_2$ ;  $p > 0,05$  ( $CT E^-$  vs  $Pb^{+2} E^-$ ).

## Resultados

A remoção do endotélio nos anéis isolados de aorta dos grupos Controle (Figura 13 A) e Chumbo (Figura 13 B) desviou a curva concentração-resposta à fenilefrina para esquerda. Nos dois grupos experimentais houve aumento tanto da  $R_{\text{máx}}$  quanto da  $pD_2$  à fenilefrina (Tabela 6 Figura 10).

A análise da diferença percentual abaixo da curva (% dAUC) mostrou que a modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina em ratos tratados por sete dias ao acetato de chumbo é significante maior quando comparados ao grupo Controle (% dAUC – CT= 138, 4  $\pm$  23,91 vs  $Pb^{+2}$ = 233,9  $\pm$  37,75) (Figura 13 C).

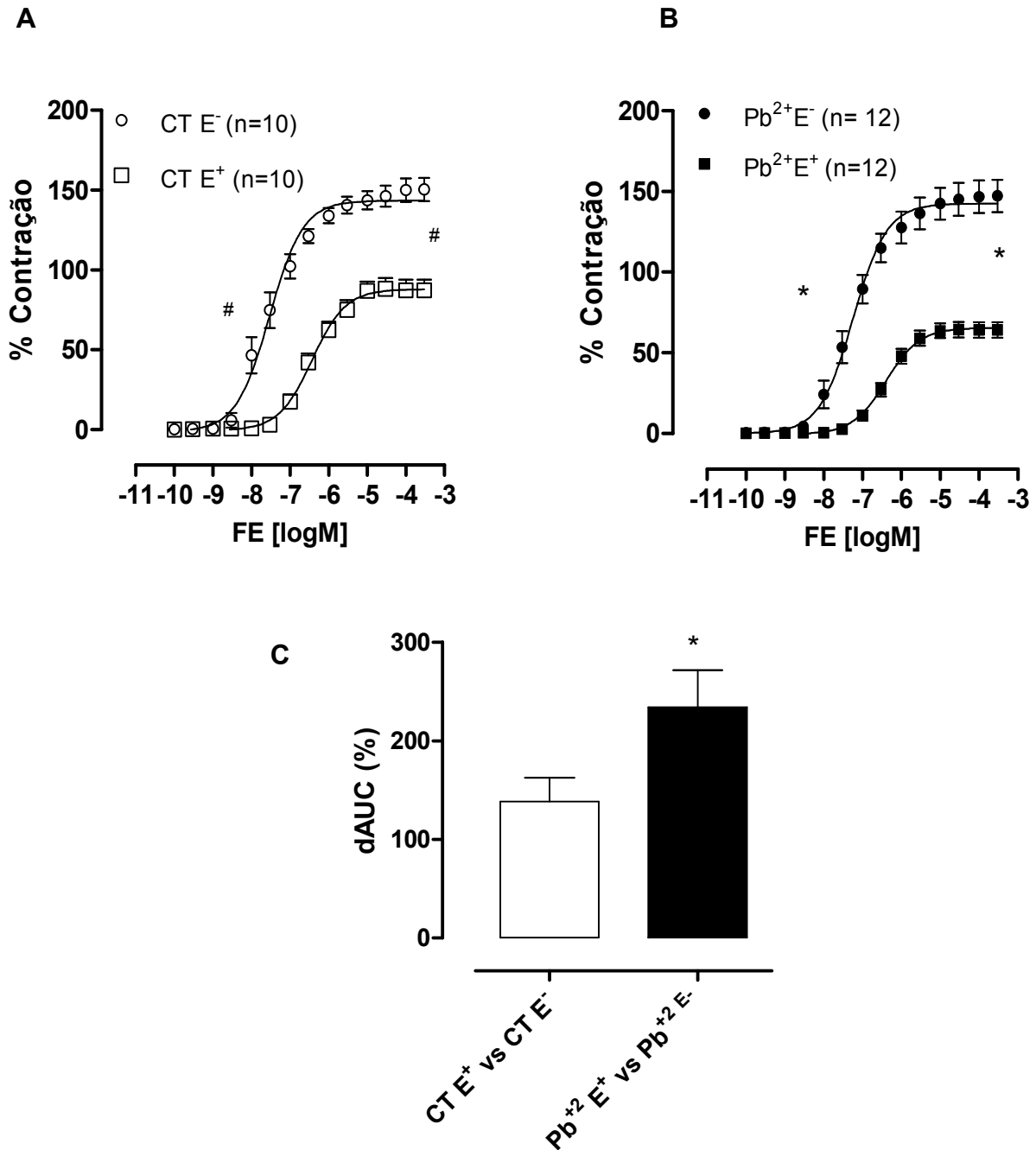
**Tabela 6:** Valores de resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis (intactos e desnudos) de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle e Chumbo.

	$R_{\text{máx}}$	$pD_2$
CT $E^+$	79,84 $\pm$ 4,46	6,55 $\pm$ 0,10
CT $E^-$	150, 4 $\pm$ 7,32 <sup>#</sup>	7,65 $\pm$ 0,14 <sup>#</sup>
$Pb^{+2}$ $E^+$	66,15 $\pm$ 4,66	6,29 $\pm$ 0,06
$Pb^{+2}$ $E^-$	152,1 $\pm$ 10,43 <sup>*</sup>	7,37 $\pm$ 0,10 <sup>*</sup>

Valores expressos em média  $\pm$  EPM; Teste  $t$  não-pareado. <sup>#</sup> $p < 0,05$ ;  $R_{\text{máx}}$  e  $pD_2$ : CT  $E^-$  vs CT  $E^+$

<sup>\*</sup> $p < 0,05$ ;  $R_{\text{máx}}$  e  $pD_2$ :  $Pb^{+2}$   $E^-$  vs  $Pb^{+2}$ .

## Resultados



**Figura 13:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a retirada do endotélio (CT E<sup>-</sup>); (B) Chumbo (Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup>) e após a retirada do endotélio (Pb<sup>2+</sup> E<sup>-</sup>); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo entre os grupos: Controle (não-preenchido) e Chumbo (preenchido). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste t não-pareado. #p < 0,05 para pD<sub>2</sub> e Rmáx= CT E<sup>+</sup> vs CT E<sup>-</sup>; \*p < 0,05 para pD<sub>2</sub> e Rmáx= Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>2+</sup> E<sup>-</sup> - e % dAUC - CT E<sup>+</sup> e E<sup>-</sup> vs Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup> e E<sup>-</sup>.



## Resultados

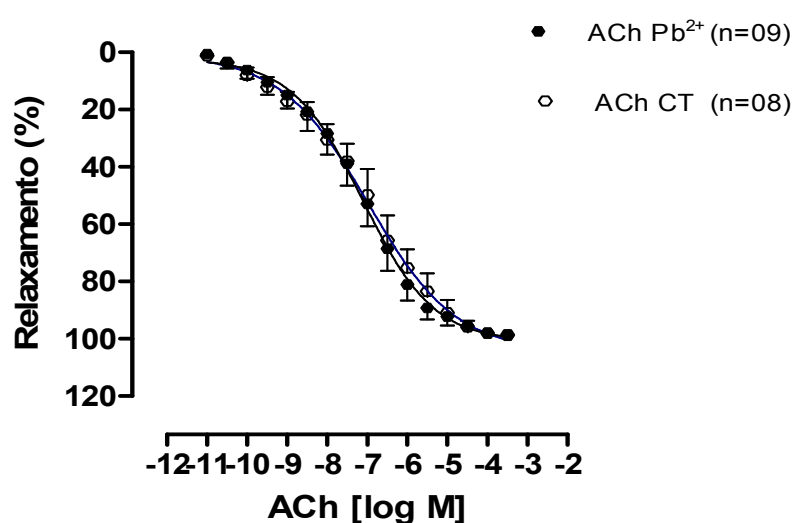
## 4.8 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

O relaxamento mediado pelo endotélio foi avaliado através da curva concentração-resposta à ACh. Como esperado, houve relaxamento concentração-resposta em todos os anéis isolados de aorta. Nenhuma observação estatisticamente significativa foi observada nos valores de  $R_{\text{máx}}$  e  $pD_2$  entre os grupos estudados (Tabela 7; Figura 14).

**Tabela 7:** Resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (ACh CT) e Chumbo (ACh  $Pb^{+2}$ ). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com à fenilefrina.

	$R_{\text{máx}}$ (%)	$pD_2$
ACh CT	$98,90 \pm 0,97$	$7,13 \pm 0,32$
ACh $Pb^{+2}$	$99,37 \pm 0,50$	$7,58 \pm 0,58$

Valores expressos em média  $\pm$  EPM; Teste  $t$  não-pareado.  $p > 0,05$ .



**Figura 14:** Curvas concentração-resposta à acetilcolina para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle (ACh CT) e Chumbo (ACh  $Pb^{+2}$ ). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste  $t$  não-pareado.  $p > 0,05$ .

## Resultados

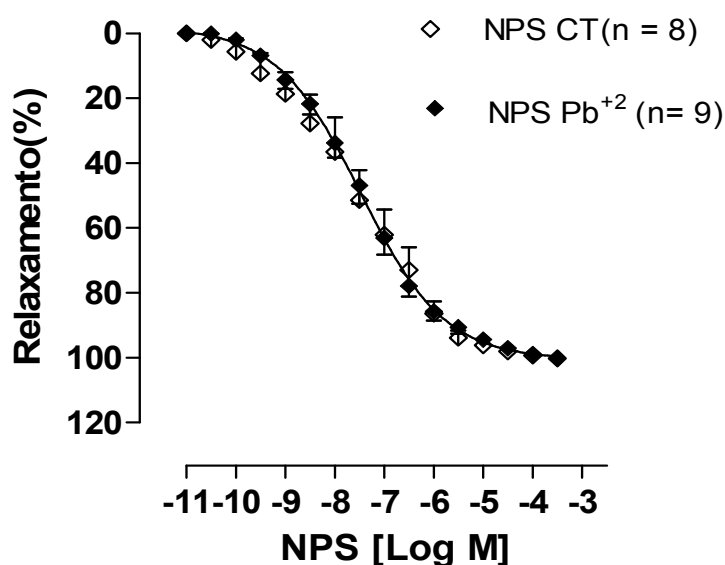
## 4.9 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através do efeito induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS), que de maneira concentração dependente inibiu a contração induzida pela fenilefrina. A resposta ao relaxamento induzida pelo nitroprussiato de sódio não foi diferente nos grupos estudados. Nenhuma observação estatisticamente significativa foi observada nos valores de  $R_{\text{máx}}$  e  $pD_2$  desses grupos (Tabela 8; Figura 15).

**Tabela 8:** Resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e a sensibilidade ( $pD_2$ ) induzida pelo nitroprussiato de sódio em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (NPS CT) e Chumbo (NPS  $Pb^{+2}$ ). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contração com fenilefrina.

	$R_{\text{máx}}$ (%)	$pD_2$
NPS CT	100,20 $\pm$ 0,24	7,63 $\pm$ 0,33
NPS $Pb^{+2}$	100,40 $\pm$ 0,19	7,43 $\pm$ 0,13

Valores expressos em média  $\pm$  EPM; Teste  $t$  não-pareado.  $p > 0,05$ .



**Figura 15:** Curvas concentração-resposta ao NPS para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle (NPS CT) e Chumbo (NPS Pb<sup>2+</sup>). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste t não-pareado.  $p > 0,05$ .

#### 4.10 EFEITO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

Os resultados apresentados anteriormente mostraram que o tratamento por sete dias com baixa concentração de chumbo foi capaz de diminuir a resposta máxima (R<sub>máx</sub>) à fenilefrina e esta diminuição foi abolida após a lesão endotelial. Com a finalidade de avaliar a participação dos fatores endoteliais nessa resposta, foram realizados os protocolos a seguir com seus respectivos resultados.

## Resultados

**4.10.1 Participação da via do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.**

Após o bloqueio da via do NO com L-NAME (100 $\mu$ M) ocorreu aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina nos anéis isolados de aorta dos grupos Controle e Chumbo, aumentando tanto a R<sub>máx</sub> quanto a pD<sub>2</sub> à fenilefrina (Tabela 9; Figura 16 A). Todavia, no grupo Chumbo, esse aumento foi em maior magnitude (Tabela 8; Figura 16 B).

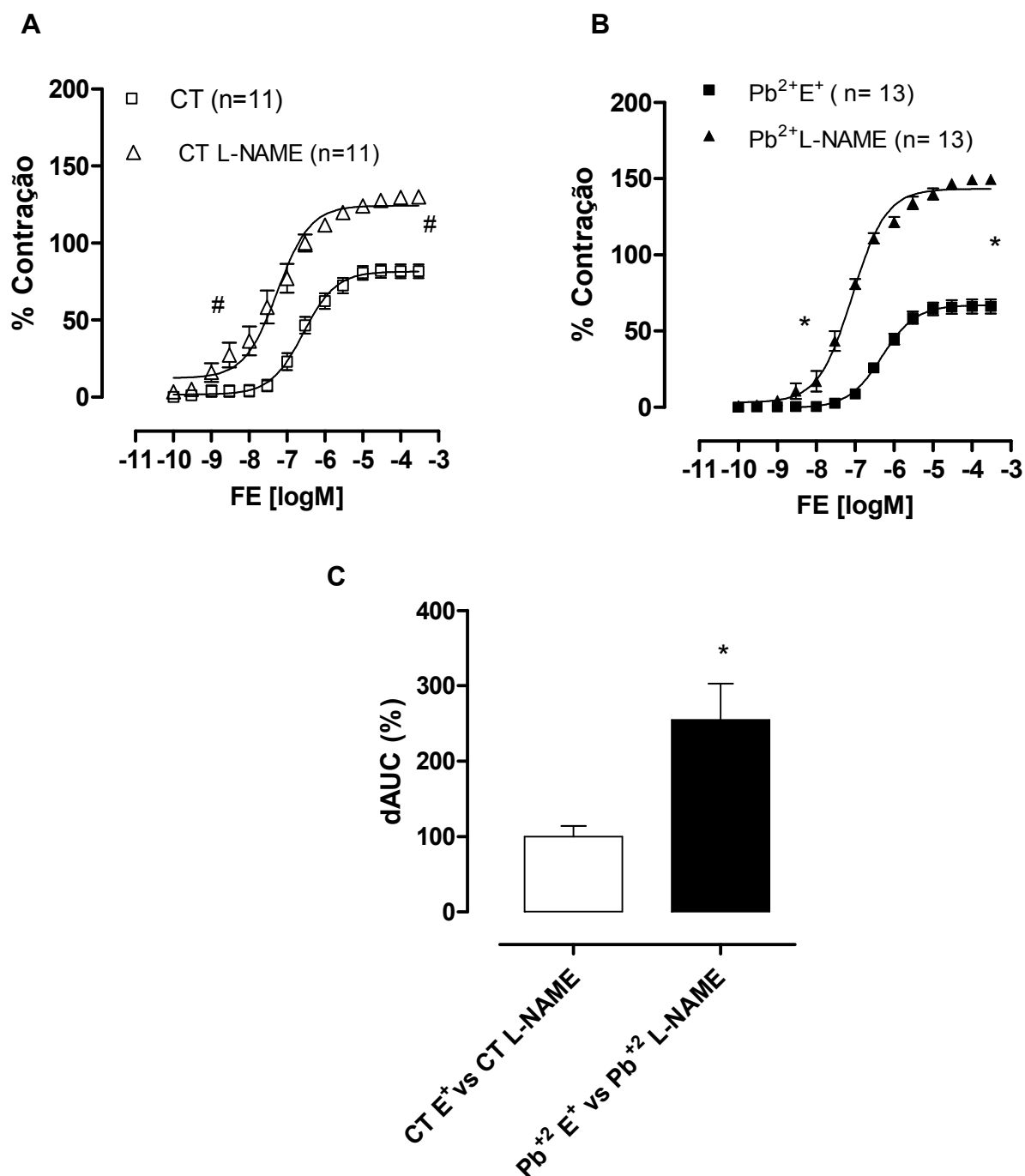
Visando uma melhor comparação desses resultados, foi calculada a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) dos gráficos. Assim, foi possível observar um aumento na biodisponibilidade de NO no grupo exposto ao metal (% dAUC CT= 99,92  $\pm$  14,30 vs Pb<sup>+2</sup> = 243,3  $\pm$  46,07%, \*p<0,05, Teste t) Figura 12 C.

**Tabela 9:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo , na presença e na ausência de L-NAME.

	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
CT E <sup>+</sup>	81,80 $\pm$ 4,46	6,55 $\pm$ 0,1
CTE <sup>+</sup> L-NAME	130, 1 $\pm$ 2,57 <sup>#</sup>	7,69 $\pm$ 0,23 <sup>#</sup>
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup>	66,15 $\pm$ 4,66	6,29 $\pm$ 0,06
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup> L-NAME	148,9 $\pm$ 3,22*	7,12 $\pm$ 0,05*

Valores expressos em média  $\pm$  EPM; Teste t não-pareado.<sup>#</sup>p<0,05; R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub>: CT E<sup>+</sup> vs CT E<sup>+</sup> L-NAME \*p<0,05; R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub>: Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup> L-NAME.

## Resultados

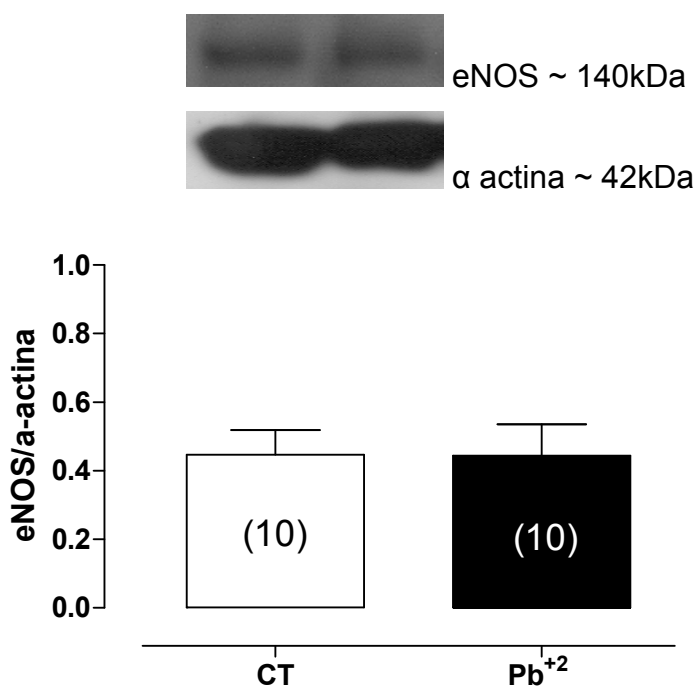


**Figura 16:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT  $E^+$ ) e após a incubação com L-NAME (L-NAME CT  $E^+$ ); (B) Chumbo ( $Pb^{2+}E^+$ ) e após a incubação com L-NAME (L-NAME  $Pb^{2+}E^+$ ); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos: Controle (não-preenchido) e Chumbo (preenchido). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t não-pareado. # $p < 0,05$  para CT  $E^+$  vs CT  $E^+L-NAME$ ; \* $p < 0,05$  para  $pD_2$  e  $R_{m\acute{a}x} = Pb^{2+}E^+$  vs  $Pb^{2+}E^+L-NAME$  - e % dAUC - CT vs  $Pb^{2+}$ .

## Resultados

## 4.10.1.1 Expressão Protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) em aorta de ratos

Visando explicar por qual mecanismo estaria ocorrendo o aumento da modulação endotelial pelo NO, a expressão protéica da eNOS foi avaliada. Assim, em condições basais (segmentos arteriais retirados logo após o animal ser sacrificado) a expressão da eNOS foi detectada, através da técnica de Western Blot em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Chumbo. Foi observado nestas artérias que a exposição a baixas concentrações de chumbo durante sete dias não provocou alteração na expressão protéica da eNOS (CT =  $0,49 \pm 0,08$  n= 10; Pb<sup>+2</sup> =  $0,44 \pm 0,09$  n= 10) (Figura 17).

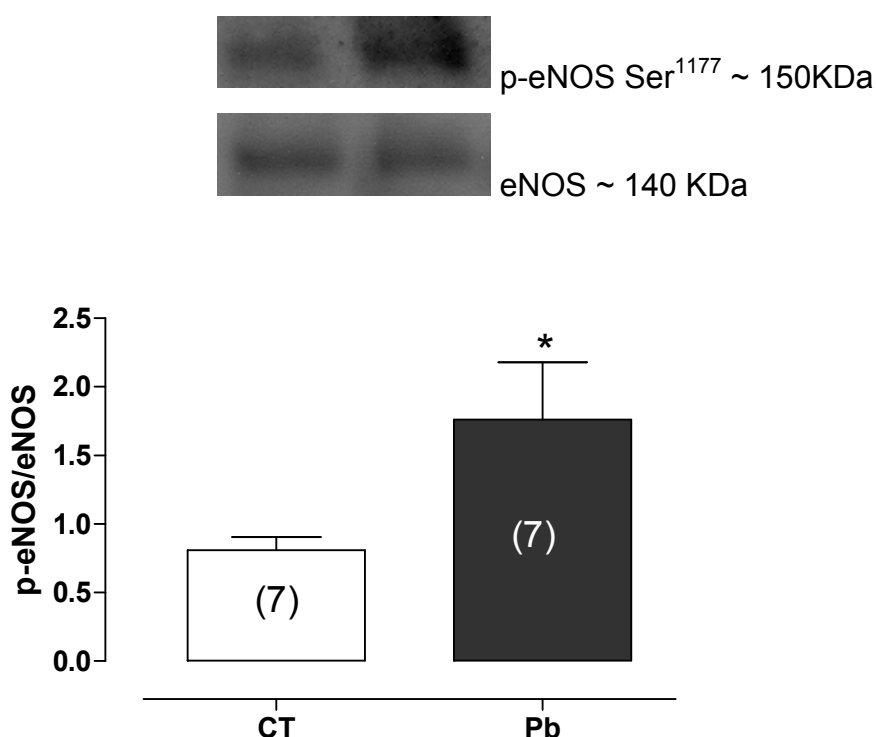


**Figura 17:** Resultados da expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos CT (n=10) e Pb<sup>+2</sup> (n=10). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da eNOS e da α actina. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas da eNOS e da α actina. Teste t: p>0,05.

## Resultados

## 4.10.1.2 Razão da expressão Protéica da isoforma fosforilada endotelial da sintase do óxido nítrico (p-eNOS) em relação isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) em aorta de ratos

Avaliou-se, em seguida, a fosforilação da eNOS, no resíduo Ser<sup>1177</sup>. Esse resíduo, quando fosforilado, aumenta a atividade da enzima e a produção de NO (Dimmeler *et al.*, 1999; McCabe *et al.*, 2000; Fleming & Busse, 2003; Wang *et al.*, 2010). Apesar da expressão da eNOS estar inalterada após o tratamento com acetato de chumbo, houve um aumento da expressão desta enzima em sua forma fosforilada no resíduo Ser<sup>1177</sup> (p-eNOS), com significativo aumento da razão p-eNOS/eNOS no grupo Chumbo quando comparado ao Controle (CT=  $0,80 \pm 0,09$ , n= 7; Pb<sup>+2</sup>=  $1,76 \pm 0,41$ , n= 7) (Figura 18).



**Figura 18:** Resultados da expressão protéica da isoforma fosforilada endotelial da sintase do óxido nítrico (p-eNOS) em relação à isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos CT (n=7) e Pb<sup>+2</sup> (n=7). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da p-eNOS abaixo da eNOS. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como razão entre a densidade das bandas da p-eNOS e da eNOS. Teste t: \*p<0,05.

## Resultados

#### 4.10.2 Participação da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

Na condição Controle a Aminoguanidina (50  $\mu$ M) não alterou a resposta contrátil à fenilefrina (Tabela 10; Figura 19 A). Contudo, na presença desse fármaco, houve aumento de reatividade à fenilefrina no grupo tratado por sete dias com acetato de chumbo (Tabela 9; Figura 19 B). Os resultados acima sugerem que a redução de reatividade à FE (Figura 8) induzido pelo tratamento com chumbo é, em parte, derivado do aumento da liberação de NO derivado da iNOS.

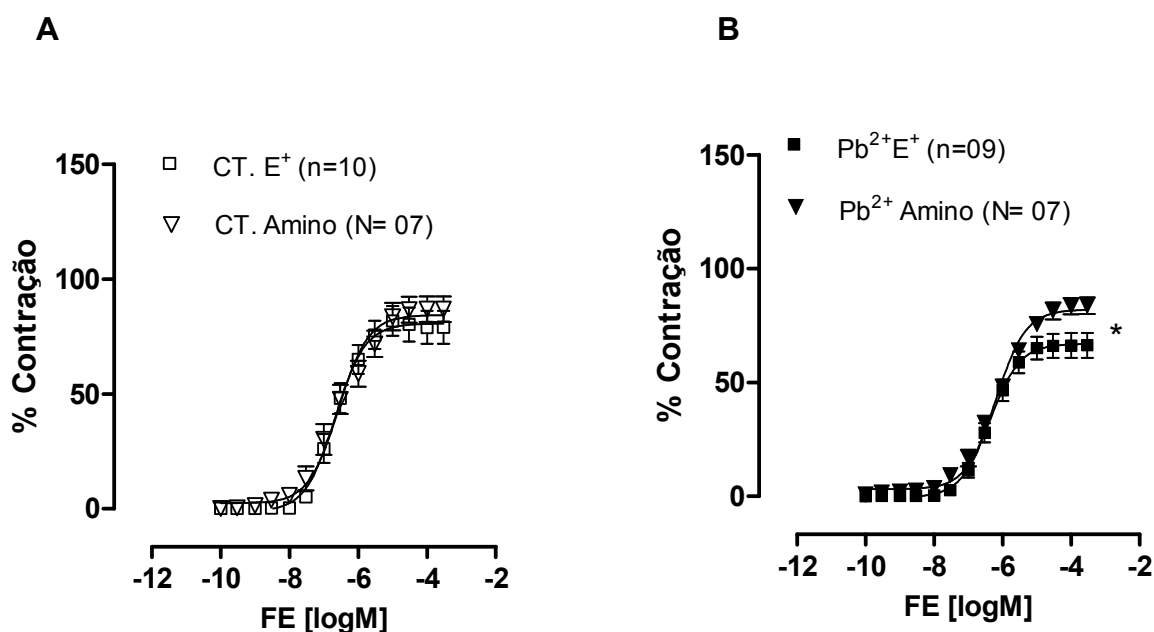
**Tabela 10:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Aminoguanidina.

	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
CT E <sup>+</sup>	83,29 $\pm$ 5,99	6,09 $\pm$ 0,15
CT E <sup>+</sup> AMG	86,93 $\pm$ 5,56	6,36 $\pm$ 0,19
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup>	60,35 $\pm$ 5,99	6,14 $\pm$ 0,08
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup> AMG	83,71 $\pm$ 2,57*	6,23 $\pm$ 0,08

Valores expressos em média  $\pm$  EPM; Teste *t* não-pareado.\*p<0,05; R<sub>máx</sub>:Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs AMG Pb<sup>+2</sup>.



## Resultados

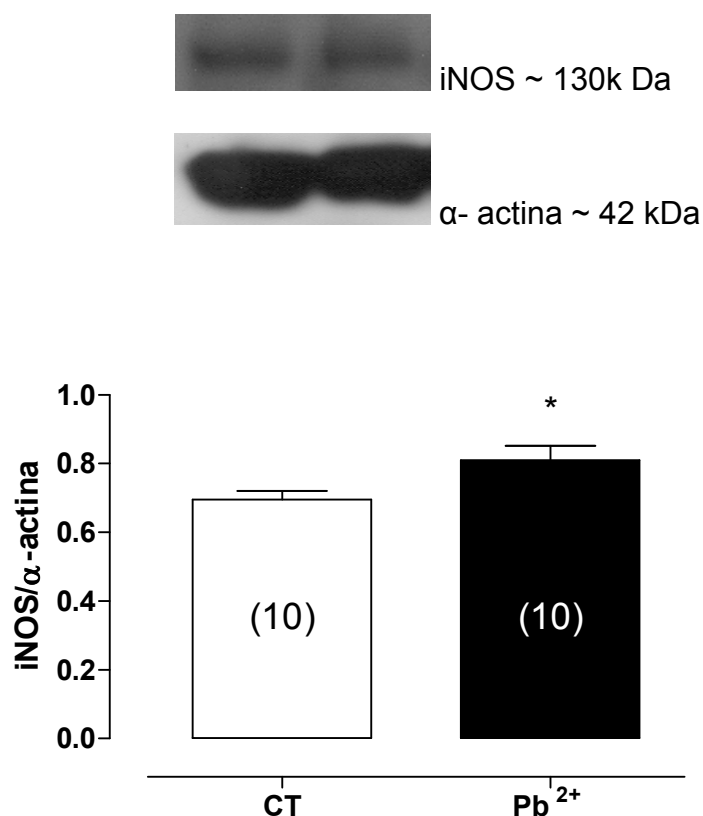


**Figura 19:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT  $E^+$ ) e após a incubação com AMG (AMG CT  $E^+$ ); e (B) Chumbo ( $Pb^{+2} E^+$ ) e após a incubação com AMG ( $Pb^{+2} E^+$ ). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t não-pareado.  $p > 0,05$  para  $R_{\max}$ : CT  $E^+$  vs AMG CT; \* $p < 0,05$  para  $R_{\max}$ :  $Pb^{+2} E^+$  vs  $Pb^{+2}$  AMG.

#### 4.10.2.1 Expressão Protéica da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) em aorta de ratos

A expressão da iNOS em condições basais (segmentos arteriais retirados logo após o animal ser sacrificado) foi detectada, através da técnica de Western Blot em segmentos de aorta torácica de ratos do grupo Controle e Chumbo. Foi observado nestas artérias que a exposição a baixas concentrações de chumbo durante sete dias aumentou a expressão protéica da iNOS (CT =  $0.69 \pm 0.02$ ,  $n=9$ ;  $Pb^{+2}$  =  $0.81 \pm 0.04$ ,  $n=10$ ) (Figura 20).

## Resultados



**Figura 20:** Resultados da expressão protéica da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos CT (n=10) e Pb<sup>2+</sup> (n=10). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da iNOS e da α actina. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas da iNOS e da α actina. Teste t: \*p<0,05.

#### 4.10.3 Participação dos canais para K<sup>+</sup> no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

A incubação com TEA (2 mM) alterou a resposta contrátil à fenilefrina em ambos grupos experimentais (Tabela 11; Figura 18 A). Entretanto, esta resposta foi maior no grupo tratado por sete dias com acetato de chumbo (Tabela 11; Figura 21B).

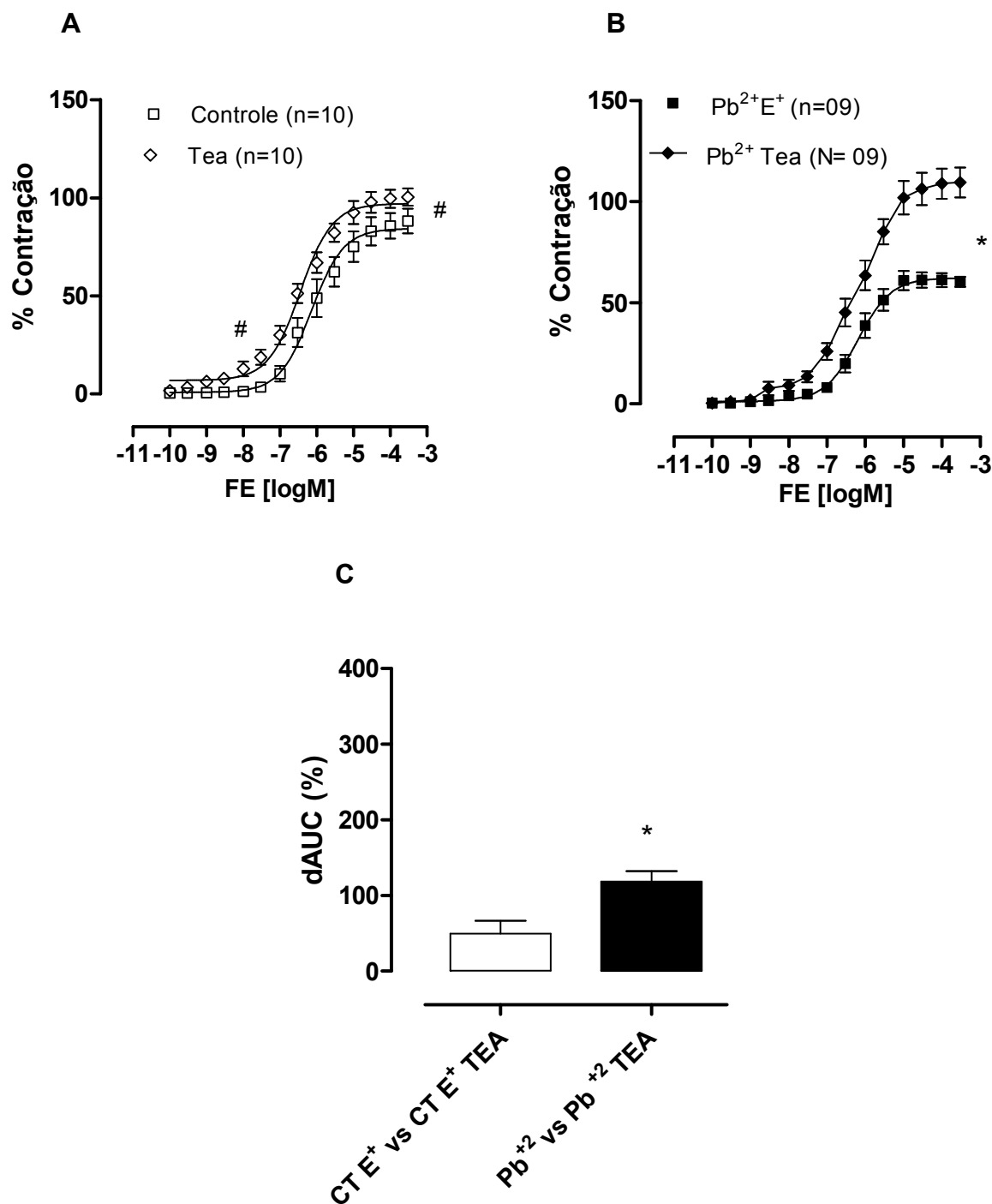
## Resultados

**Tabela 11:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de TEA.

	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
CT E <sup>+</sup>	82,06 ± 7,99	6,09 ± 0,15
CT E <sup>+</sup> TEA	100,04 ± 3,70 <sup>#</sup>	6,50 ± 0,11 <sup>#</sup>
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup>	60,35 ± 2,57	6,14 ± 0,08
Pb <sup>+2</sup> TEA	98,29 ± 5,30 <sup>*</sup>	6,30 ± 0,08

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado. <sup>#</sup>p<0,05; R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub>: CT E<sup>+</sup> vs CT E<sup>+</sup> TEA <sup>\*</sup>p<0,05; R<sub>máx</sub>: Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup> TEA.

## Resultados



**Figura 21:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT  $E^+$ ) e após a incubação com TEA (CT $E^+TEA$ ); (B) Chumbo ( $Pb^{+2} E^+$ ) e após a incubação com TEA ( $Pb^{+2} E^+ TEA$ ). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t não-pareado. C) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos Controle (não-preenchido) e Chumbo (preenchido). #  $p < 0,05$  para  $R_{m\acute{a}x}$  e  $pD_2$  : CT  $E^+$  vs CT  $E^+ TEA$  ; \* $p < 0,05$  para  $R_{m\acute{a}x}$ :  $Pb^{+2} E^+$  vs  $Pb^{+2} TEA$ .

#### **4.10.4 Participação da Angiotensina II local no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.**

Neste protocolo investigamos a participação da Angiotensina II local na resposta contrátil à fenilefrina no tratamento de sete dias com acetato de chumbo. O enalapril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) e também o losartan, um inibidor específico de receptor para Angiotensina II do subtipo AT<sub>1</sub> foram usados em ratos controle e tratados com chumbo.

##### **4.10.4.1 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a enzima conversora da angiotensina (ECA)**

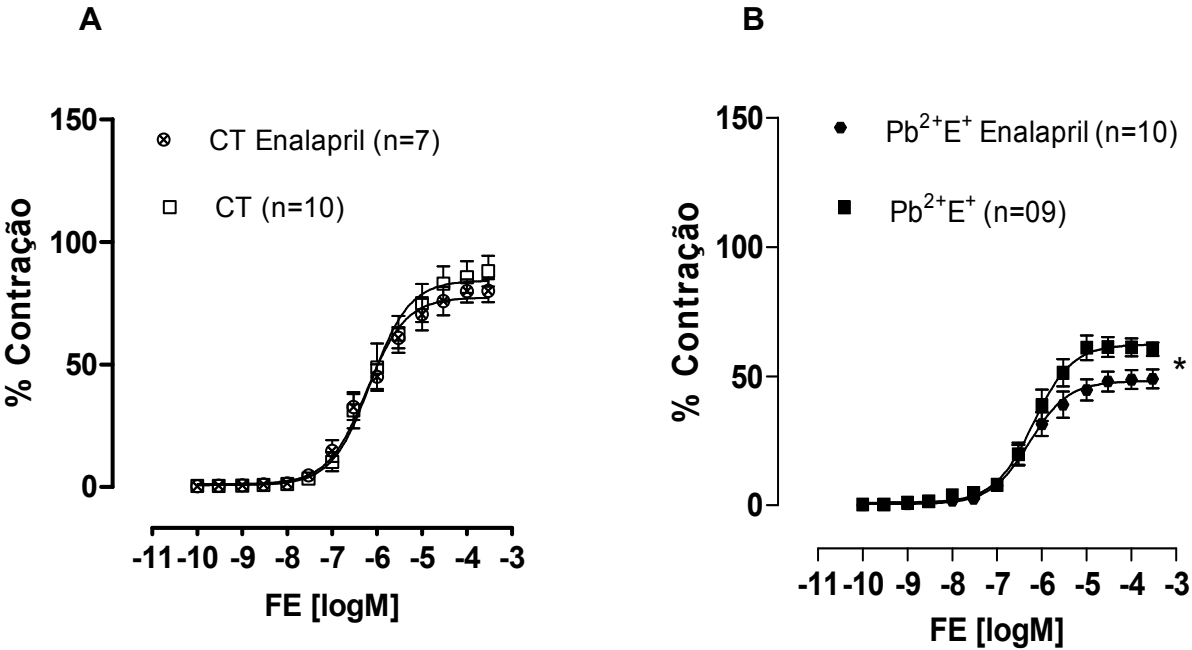
Na condição Controle o Enalapril (10 µM) não alterou a resposta contrátil à fenilefrina (Tabela 12; Figura 22 A). No entanto, na presença deste fármaco, houve uma diminuição da reatividade à fenilefrina no grupo tratado com acetato de chumbo (Tabela 12; Figura 22 B). Este fato indica que a ECA está envolvida na ação vascular do chumbo. Com o aumento da atividade da ECA pode-se ter maior liberação de angiotensina II local para interagir com os receptores do subtipo AT<sub>1</sub>.

Resultados

**Tabela 12:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Enalapril.

	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
CT E <sup>+</sup>	82,06 ± 6,48	6,09 ± 0,15
CT E <sup>+</sup> Enalapril	79,12 ± 2,69	6,21 ± 0,13
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup>	60,35 ± 2,57	6,14 ± 0,08
Pb <sup>+2</sup> Enalapril	48,93 ± 2,53*	6,20 ± 0,13

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado.\**p*<0,05; R<sub>máx</sub> : Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs Enalapril Pb<sup>+2</sup>.



**Figura 22:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a incubação com Enalapril (CT E<sup>+</sup> Enalapril); (B) Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>) e após a incubação com Enalapril (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> Enalapril); O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste *t* não-pareado. *p*>0,05 para R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub>: CT E<sup>+</sup> vs CT E<sup>+</sup> Enalapril; \**p*< 0,05 R<sub>máx</sub>: Pb<sup>+2</sup>E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup>E<sup>+</sup> Enalapril.

## Resultados

4.10.4.2 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT<sub>1</sub>

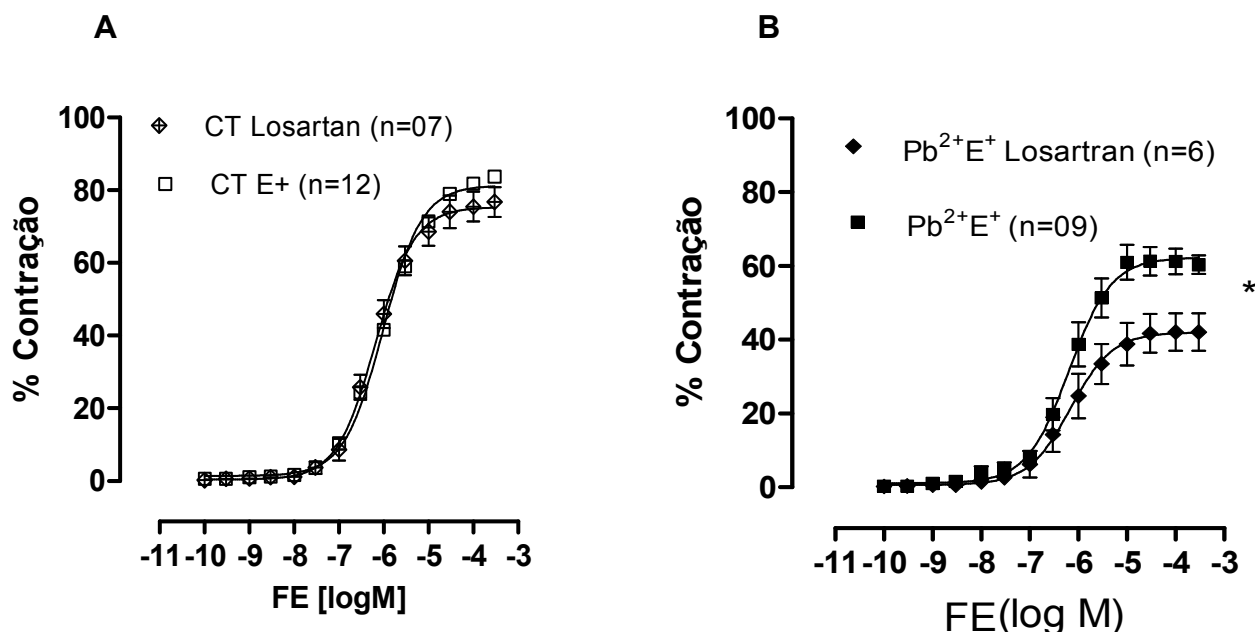
Para investigar se há maior interação da angiotensina II com os receptores do subtipo AT<sub>1</sub>, os anéis isolados foram incubados com o Losartan (10  $\mu$ M).

Na condição controle o Losartan não modificou a resposta contrátil à fenilefrina (Tabela 13, Figura 23 A). Todavia, o tratamento com acetato de chumbo reduziu a resposta máxima à fenilefrina, culminando com uma redução da R<sub>máx</sub> (Tabela 13, Figura 23 B).

**Tabela 13:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Losartan.

	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
CT E <sup>+</sup>	82,06 $\pm$ 6,48	6,09 $\pm$ 0,15
CT E <sup>+</sup> Losartran	79,77 $\pm$ 4,12	6,19 $\pm$ 0,05
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup>	60,35 $\pm$ 2,57	6,14 $\pm$ 0,08
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup> Losartran	35,13 $\pm$ 5,89*	5,98 $\pm$ 0,12
Valores expressos em média $\pm$ EPM; Teste <i>t</i> não-pareado.*p<0,05; R <sub>máx</sub> : Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup> vs Pb <sup>+2</sup> Losartan.		

## Resultados



**Figura 23:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a incubação com Losartan (CT E<sup>+</sup> Losartan); (B) Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>) e após a incubação com Losartan (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> Losartan). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; \* $p < 0,05$  Rmáx: Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> Losartan.

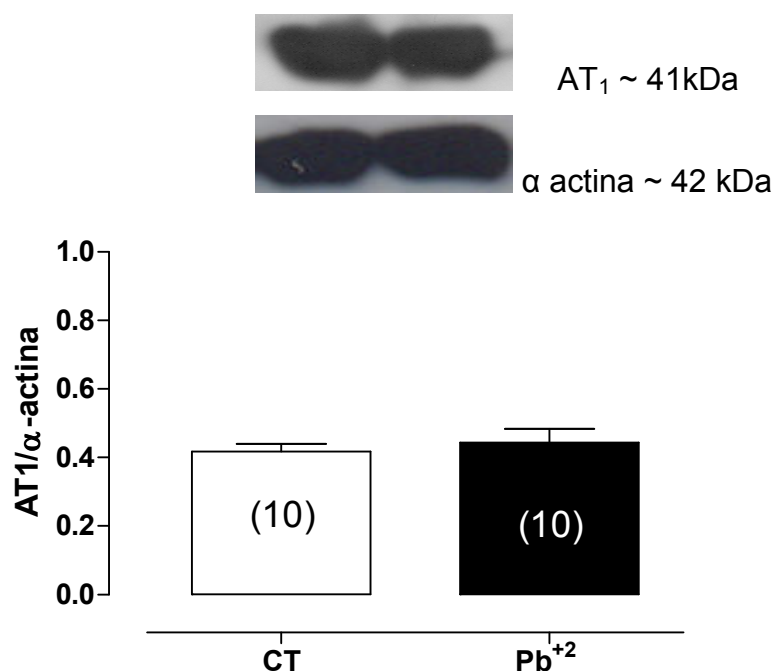
#### 4.10.4.2.1 Expressão Protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT<sub>1</sub> em aorta de ratos

A expressão dos receptores AT<sub>1</sub> em condições basais (segmentos arteriais retirados logo após o animal ser sacrificado) foi detectada, através da técnica de Western Blot em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Chumbo. Foi observado nestas artérias que a exposição ao acetato de chumbo durante sete dias não alterou na expressão protéica dos receptores AT<sub>1</sub> (CT= 0,41  $\pm$  0,02 n=10; Pb<sup>+2</sup>= 0,44  $\pm$  0,04 n=10) (Figura 24).

A análise desses resultados sugere que a exposição ao acetato de chumbo durante sete dias aumenta a participação do sistema renina angiotensina por meio da atividade plasmática da ECA sem alterar a expressão dos receptores.



## Resultados

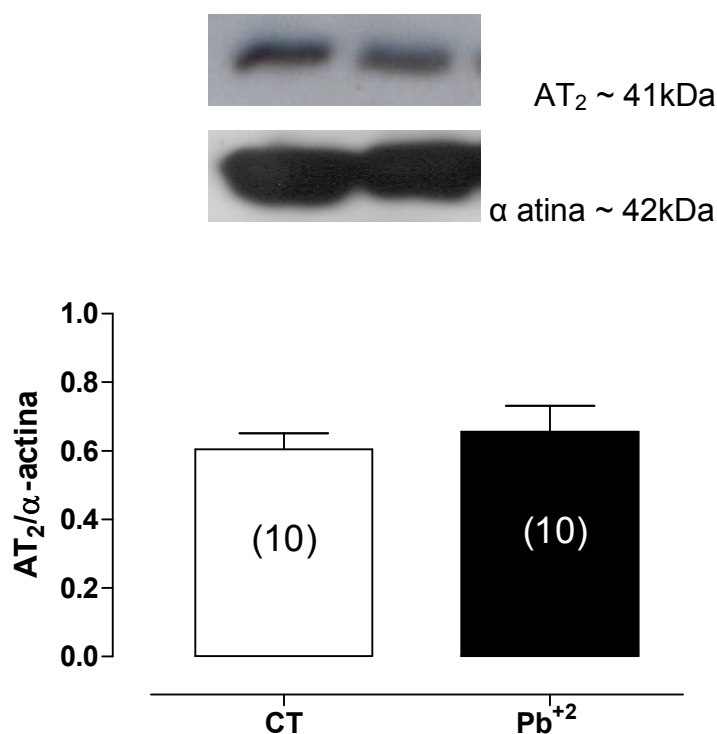


**Figura 24:** Resultados da expressão protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT<sub>1</sub>, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos CT (n=10) e Pb<sup>+2</sup> (n=10). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT<sub>1</sub> e da α actina. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor AT<sub>1</sub> e da α actina. Teste t: p>0,05 CT vs Pb<sup>+2</sup>.

#### 4.10.4.3. Expressão Protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT<sub>2</sub> em aorta de ratos

Considerando que no grupo tratado com chumbo houve uma diminuição de reatividade vascular e um aumento de NO, a expressão protéica dos receptores AT<sub>2</sub> foi detectada nos segmentos de aorta torácica de ambos os grupos experimentais através da técnica de Western Blot. A expressão protéica foi semelhante nos grupos Controle e Chumbo (CT= 0,60 ± 0,04 n= 10; Pb<sup>+2</sup>= 0,65 ± 0,07 n=10) (Figura 25).

## Resultados



**Figura 25:** Resultados da expressão protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo  $AT_2$ , por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos CT (n=10) e  $Pb^{+2}$  (n=10). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor  $AT_2$  e da  $\alpha$  actina. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor  $AT_2$  e da  $\alpha$  actina. Teste t:  $p > 0,05$  CT vs  $Pb^{+2}$ .

#### 4.10.5 Participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

##### 4.10.5.1 Influência da administração de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

A apocinina (0,3  $\mu\text{M}$ ) não alterou a reatividade vascular à fenilefrina nos segmentos de aorta do grupo Controle (Figura 26 A). Todavia, houve uma redução da reatividade vascular no grupo tratado com chumbo por sete dias (Figura 26 B) (Tabela 14).

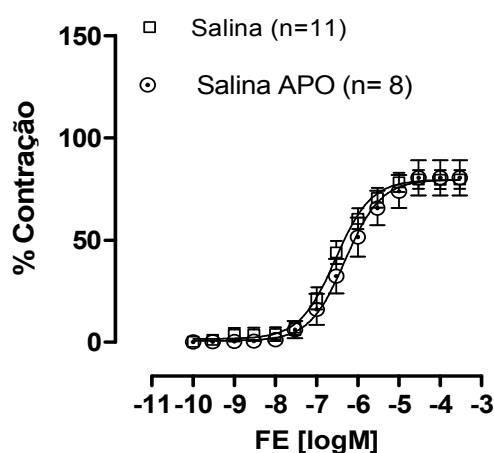
## Resultados

**Tabela 14:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Apocinina.

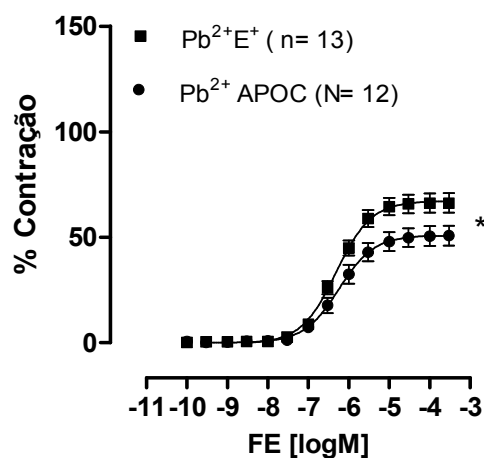
	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
CT E <sup>+</sup>	81,80 ± 4,74	6,55 ± 0,10
CT E <sup>+</sup> Apocinina	80,80 ± 9,69	6,25 ± 0,15
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup>	66,15 ± 4,66	6,29 ± 0,06
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup> Apocinina	49,08 ± 5,22*	6,15 ± 0,10

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado.\*p<0,05; R<sub>máx</sub>: Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup>Apocinina.

A



B



**Figura 26:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a incubação com Apocinina (CT E<sup>+</sup> APO); (B) Chumbo (Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup>) e após a incubação com Apocinina (Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup> APO). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; \*p< 0,05 R<sub>máx</sub>: Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup> Apocinina.

## Resultados

4.10.5.2 Influência da administração da superóxido dismutase (SOD), um “varredor” do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

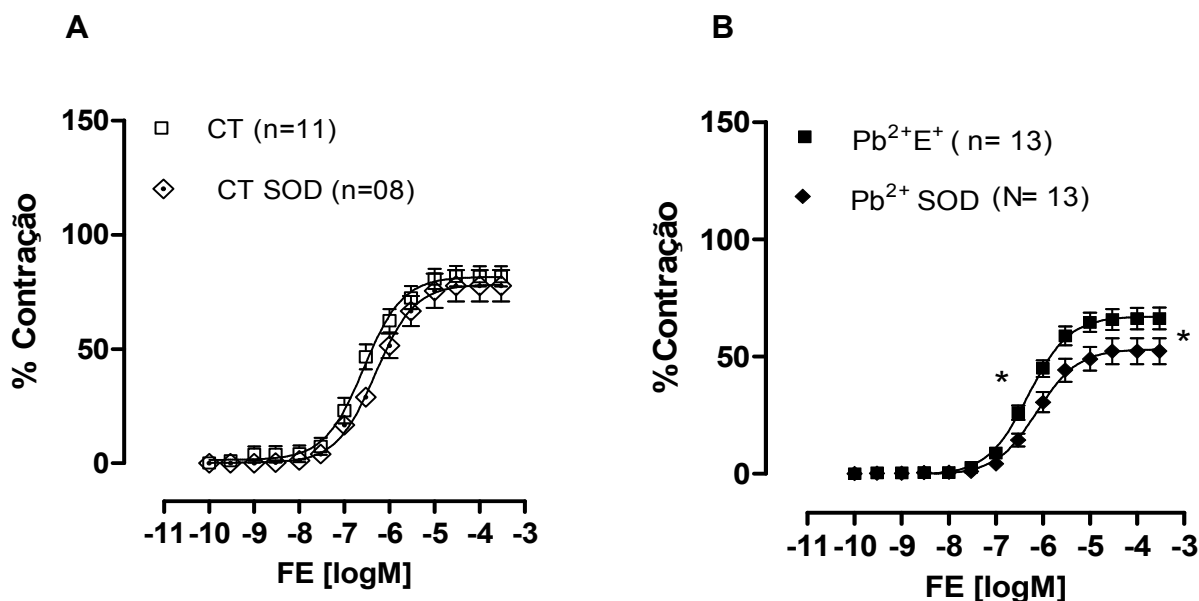
A avaliação da presença do  $O_2^-$  nas aortas isoladas foi realizada através da incubação de SOD ( $150 \text{ U ml}^{-1}$ ) no banho. A SOD não alterou a reatividade vascular à fenilefrina nos segmentos de aorta do grupo Controle (Figura 27 A). Entretanto, houve uma redução da reatividade vascular no grupo tratado com acetato de chumbo por sete dias (Figura 27 B) (Tabela 15).

**Tabela 15:** Resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e a sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de SOD.

	$R_{\text{máx}}$ (g)	$pD_2$
CT $E^+$	$81,80 \pm 4,74$	$6,55 \pm 0,10$
CT $E^+$ SOD	$69,06 \pm 2,89$	$6,32 \pm 0,08$
Pb <sup>+2</sup> $E^+$	$66,15 \pm 4,66$	$6,29 \pm 0,06$
Pb <sup>+2</sup> $E^+$ SOD	$51,54 \pm 5,32^*$	$6,07 \pm 0,06$

Valores expressos em média  $\pm$  EPM; Teste  $t$  não-pareado. \* $p < 0,05$ ;  $R_{\text{máx}}$ : Pb<sup>+2</sup>  $E^+$  vs Pb<sup>+2</sup>SOD.

## Resultados



**Figura 27:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a incubação com SOD (CT E<sup>+</sup>SOD); (B) Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>) e após a incubação com SOD (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>SOD). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; \*p < 0,05 Rmáx: Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>SOD.

4.10.5.3 Influência da administração da Catalase, um “varredor” de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

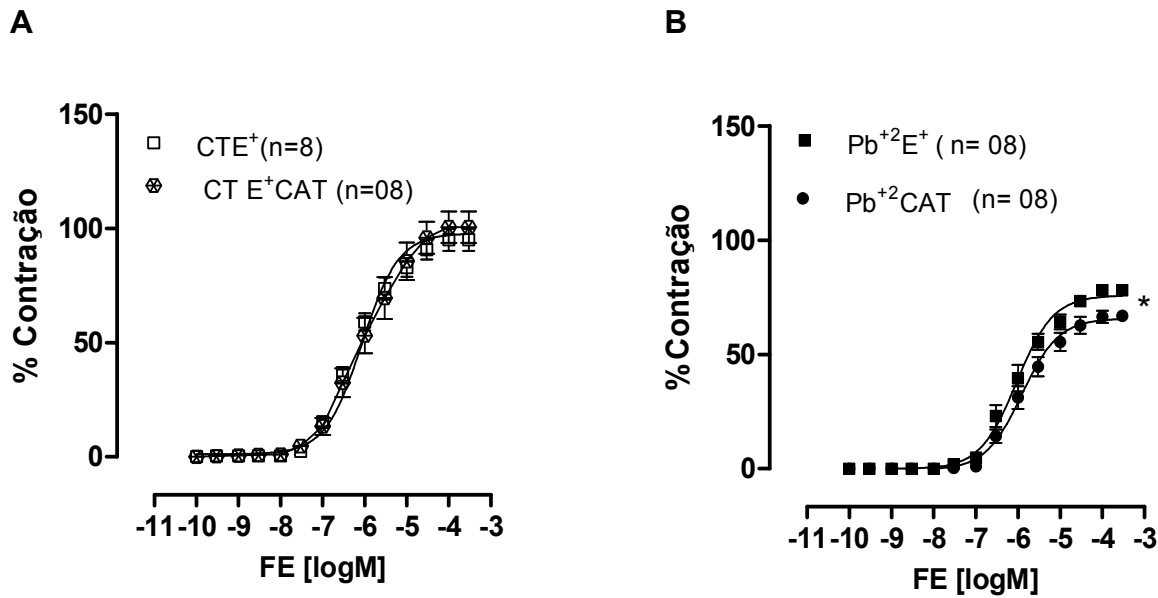
A participação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na resposta contrátil à fenilefrina foi avaliada em experimentos em que os anéis eram incubados com a catalase (1000 U/ml) e foi observada que a catalase não modificou a resposta vascular à fenilefrina no grupo Controle (Figura 28 A). Contudo, houve uma redução da reatividade vascular no grupo tratado com acetato de chumbo por sete dias (Figura 28 B) (Tabela 16).

Resultados

**Tabela 16:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Catalase.

	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
CT E <sup>+</sup>	95,03 ± 4,74	5,75 ± 0,07
CT E <sup>+</sup> Catalase	100,5 ± 6,91	5,65 ± 0,15
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup>	78,18 ± 0,71	5,51 ± 0,12
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup> Catalase	67,86 ± 1,53*	5,38 ± 0,09

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado.\*p<0,05; R<sub>máx</sub>: Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup>Catalase.



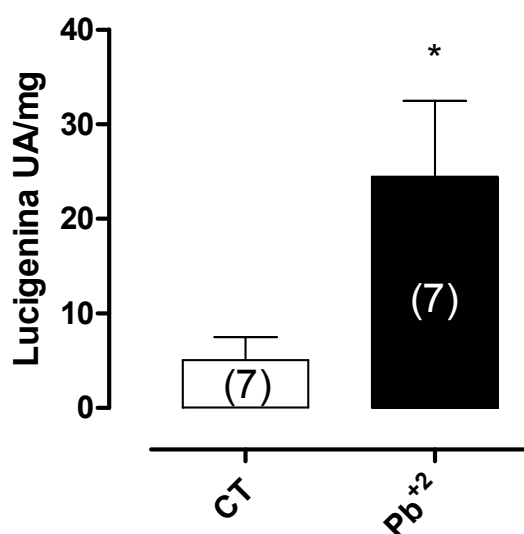
**Figura 28:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a incubação com Catalase (CT E<sup>+</sup> CAT); (B) Chumbo (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>) e após a incubação com Catalase (Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>CAT). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; \*p< 0,05 R<sub>máx</sub>: Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>vs Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup>CAT.

## Resultados

4.10.5.4 Quantificação da produção de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) “*in situ*”.4.10.5.4.1 Quantificação da produção de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) “*in situ*” através quimioluminescência dependente de Lucigenina ( $QL_{Luc}$ ).

Para verificar a influência da exposição ao acetato de chumbo por sete dias sobre a produção de  $O_2^{\cdot-}$  foi utilizada a técnica de quimioluminescência dependente de Lucigenina ( $QL_{Luc}$ ).

A produção de  $O_2^{\cdot-}$  foi significativamente maior nos anéis de aorta dos animais expostos ao tratamento com acetato de chumbo por sete dias quando comparados aos animais controle (CT=  $5,07 \pm 2,43$ , n= 7;  $Pb^{+2}$ =  $19,89 \pm 3,94$ , n= 11) (Figura 29).



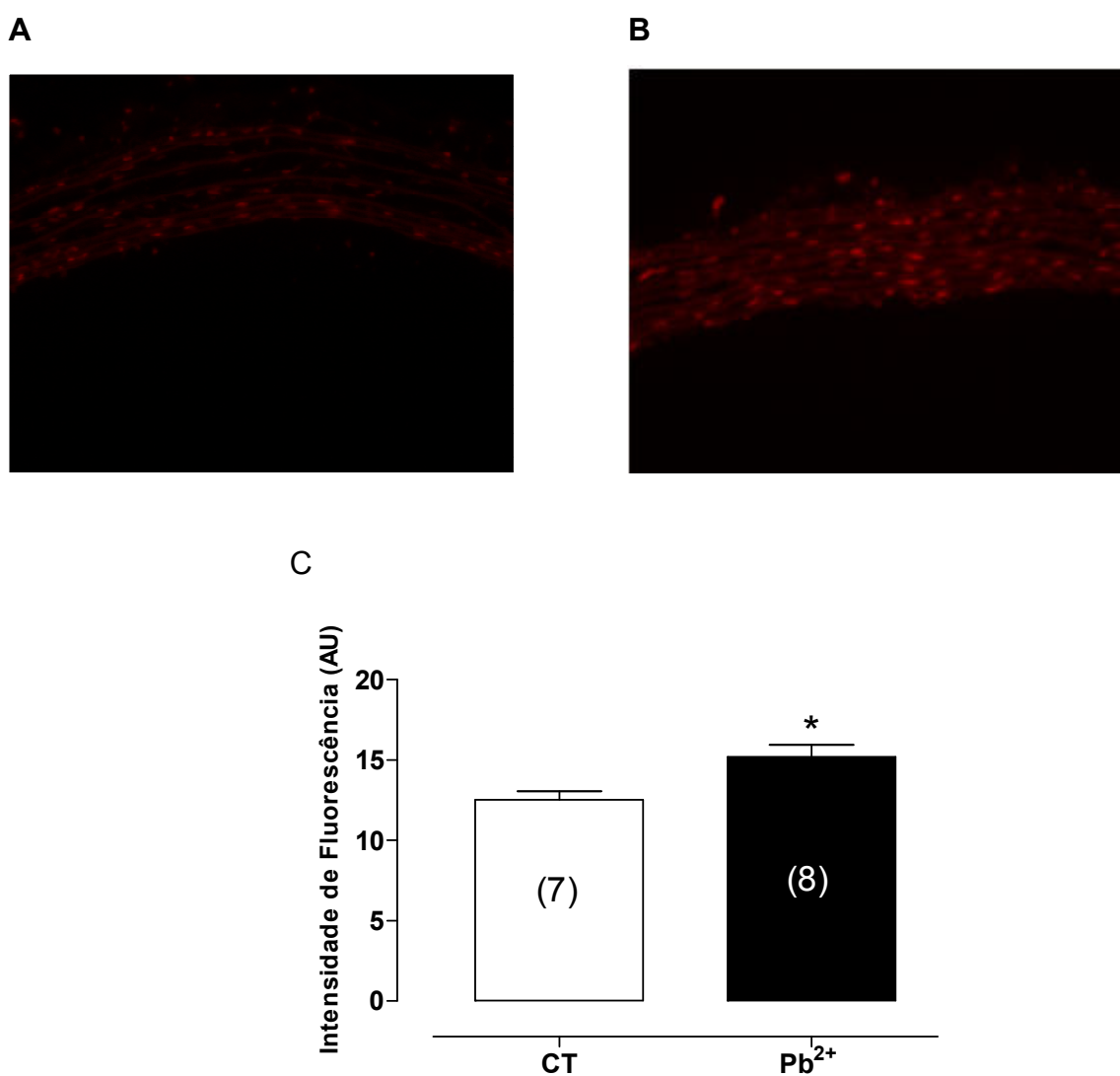
**Figura 29:** Produção de  $O_2^{\cdot-}$  em anéis de aortas dos grupos CT e  $Pb^{+2}$ . O número de animais está demonstrado entre parênteses. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t \* $p < 0,05$  CT vs  $Pb^{+2}$ .

## Resultados

4.10.5.4.2 Quantificação da produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) “in situ” através da fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE).

Outra técnica utilizada para verificar a influência da exposição ao acetato de chumbo por sete dias sobre a produção de  $O_2^-$  foi a fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE).

A produção de  $O_2^-$  foi significativamente maior nos anéis de aorta dos animais expostos ao metal quando comparados aos animais controle (CT=  $12,53 \pm 0,53$ , n=5;  $Pb^{+2}$ =  $15,20 \pm 0,43$ , n= 8) (Figura 30).



**Figura 30:** Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo (B). Gráfico com valores médios da fluorescência emitida por dihidroetídio (C). Teste t: \*p<0.05.



## Resultados

#### 4.10.6 Participação dos prostanóides derivados da Ciclooxigenase no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

A inibição da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase com indometacina (10 $\mu$ M), em anéis de aorta intactos não alterou a resposta contrátil a fenilefrina em nenhum dos grupos experimentais (Figura 31 A e 31 B, Tabela 17).

No entanto, visto que no grupo tratado com acetato de chumbo há um aumento de NO, esse efeito poderia mascarar a participação de prostanóides derivados da via da COX, analisados através da incubação com indometacina. Portanto, para excluir esse efeito do NO, foi realizado o protocolo de co-incubação de L-NAME + indometacina.

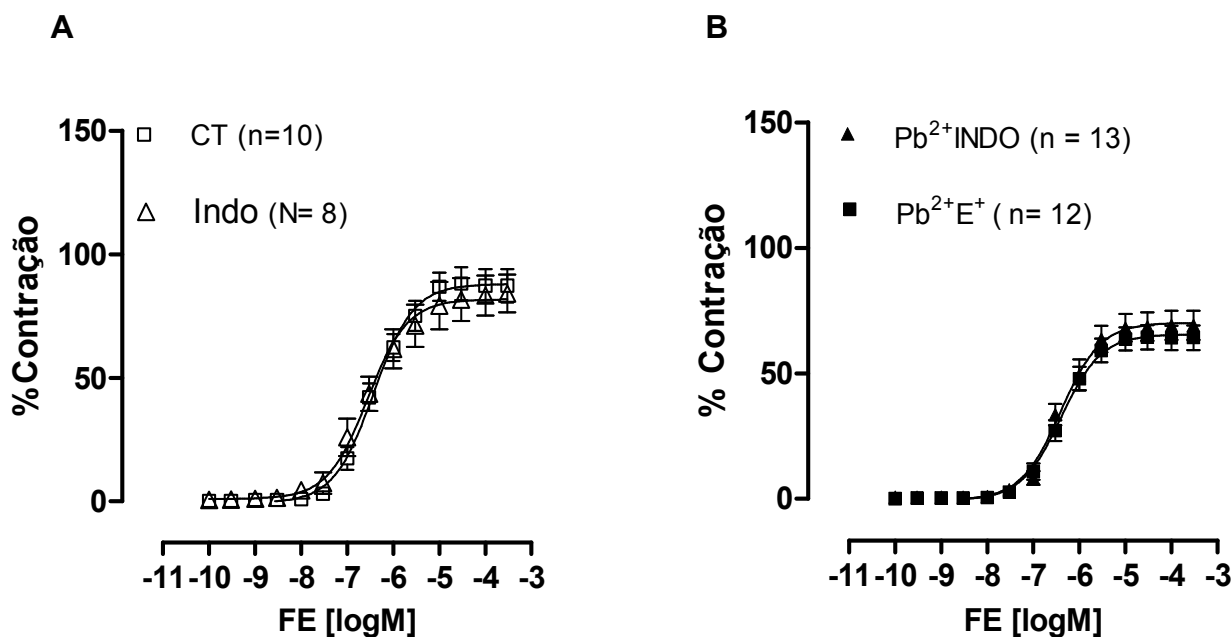
Após a Co-incubação Indometacina (10 $\mu$ M) e L-NAME (100 $\mu$ M) ocorreu aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina nos anéis isolados de aorta aumentando tanto a R<sub>máx</sub> quanto a pD<sub>2</sub> à fenilefrina nos dois grupos estudados (Tabela 18; Figura 32 A e B). Todavia, ao compararmos esses efeitos com àquele produzido somente com a incubação de L-NAME não foi possível observar nenhuma diferença (Figura 32 C), ou seja, o tratamento com chumbo não modificou a via da COX.

**Tabela 17:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Indometacina.

	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
CT E <sup>+</sup>	81,80 $\pm$ 4,39	- 6,29 $\pm$ 0,12
Indo CT	85,64 $\pm$ 8,71	- 6,64 $\pm$ 0,08
Pb <sup>+2</sup> E <sup>+</sup>	66,15 $\pm$ 4,66	- 6,29 $\pm$ 0,06
Indo Pb <sup>+2</sup>	64,61 $\pm$ 5,67	- 6,39 $\pm$ 0,07

Valores expressos em média  $\pm$  EPM; Teste *t* não-pareado. *p*>0,05; R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub>: CT E<sup>+</sup> vs Indo CT E<sup>+</sup> vs Pb<sup>+2</sup> E<sup>+</sup> vs Indo Pb<sup>+2</sup>.

## Resultados



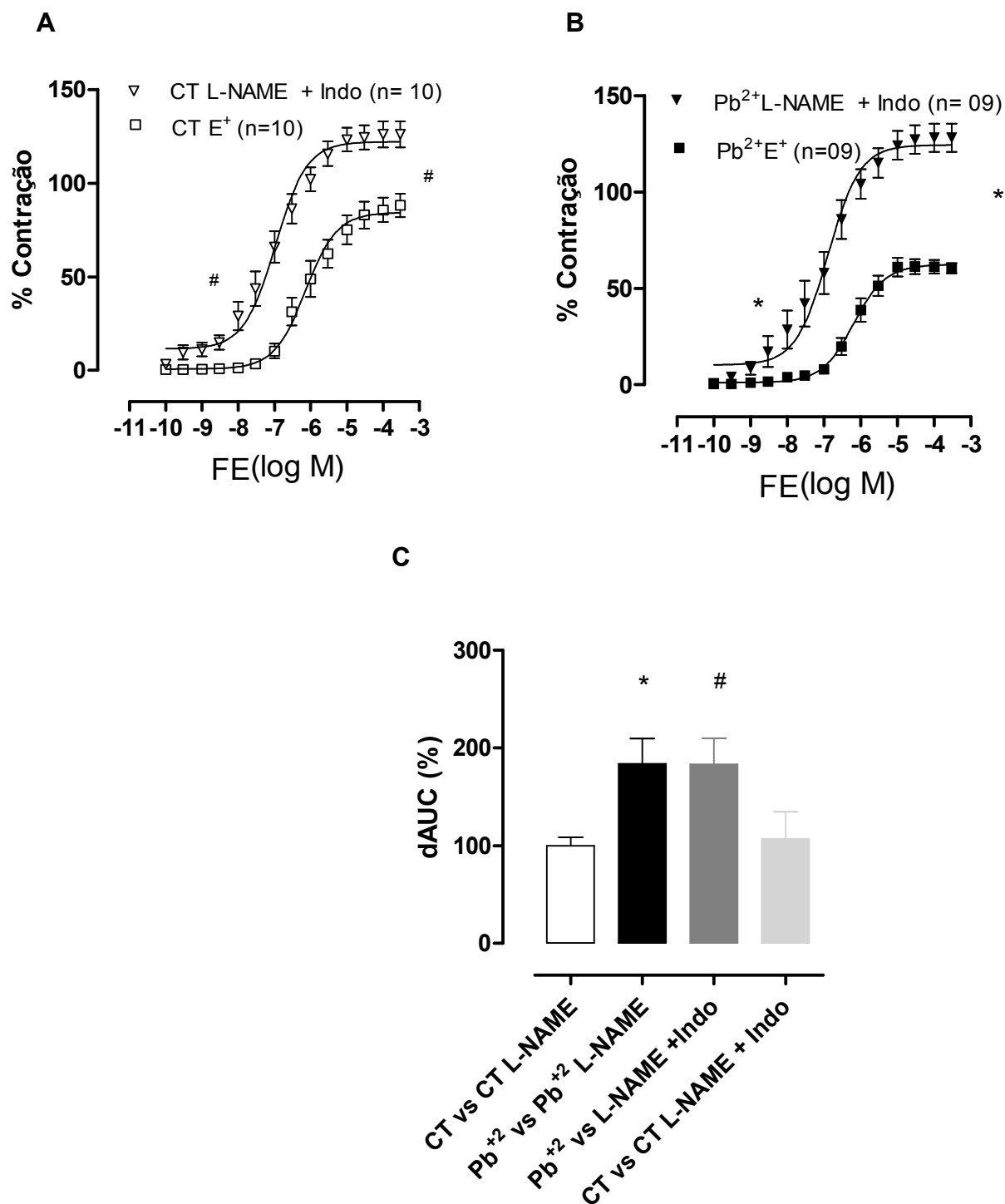
**Figura 31:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a incubação com Indometacina (Indo CT E<sup>+</sup>); (B) Chumbo (Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup>) e após a incubação com Indometacina (Indo Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup>). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; Teste t não-pareado.  $p > 0,05$  para R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub>: CT E<sup>+</sup> vs Indo CT; Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup> vs Indo Pb<sup>2+</sup>.

**Tabela 18:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo, na presença e na ausência de Indometacina + L-NAME.

	R <sub>máx</sub> (g)	pD <sub>2</sub>
CT E <sup>+</sup>	82,06 $\pm$ 6,48	6,09 $\pm$ 0,15
CT E <sup>+</sup> Indo + L-NAME	129,8 $\pm$ 8,14 <sup>#</sup>	6,98 $\pm$ 0,16 <sup>#</sup>
Pb <sup>2+</sup> E <sup>+</sup>	60,35 $\pm$ 2,47	6,14 $\pm$ 0,08
Pb <sup>2+</sup> E <sup>+</sup> Indo + L-NAME	121,40 $\pm$ 8,53 <sup>*</sup>	7,08 $\pm$ 0,08 <sup>*</sup>

Valores expressos em média  $\pm$  EPM; Teste t não-pareado. <sup>#</sup>p<0,05; R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub>: CT E<sup>+</sup> vs CT E<sup>+</sup> Indo + L-NAME; <sup>\*</sup>p<0,05; R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub>: Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup> Indo + L-NAME.

## Resultados



**Figura 32:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (CT E<sup>+</sup>) e após a incubação com Indo + L-NAME (CT E<sup>+</sup>Indo + L-NAME); (B) Chumbo (Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup>) e após a incubação com Indo + L-NAME (Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup>Indo+L-NAME); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos Controle (não-preenchido e cinza claro) e Chumbo (preenchido e cinza escuro). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste t não-pareado. #p < 0,05 para pD<sub>2</sub> e Rmáx: CT E<sup>+</sup> vs CT E<sup>+</sup> Indo + L-NAME, \*p < 0,05 para pD<sub>2</sub> e Rmáx: Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup> vs Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup> Indo + L-NAME - e % dAUC - ANOVA \*p < 0,05 para CT E<sup>+</sup>/CT E<sup>+</sup>L-NAME vs Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup>/Pb<sup>2+</sup> L-NAME; #p < 0,05 para CT E<sup>+</sup>/CT E<sup>+</sup>L-NAME +Indo vs Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup>/Pb<sup>2+</sup> L-NAME +Indo; p > 0,05 para Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup>/Pb<sup>2+</sup> L-NAME vs Pb<sup>2+</sup> E<sup>+</sup>/Pb<sup>2+</sup>L-NAME +Indo e p > 0,05 para CT E<sup>+</sup>/CTE<sup>+</sup>L-NAME vs CT E<sup>+</sup> / CT E<sup>+</sup>L-NAME+Indo.

## 5 DISCUSSÃO

O chumbo é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em humanos (Vupputuri *et al.*, 2003; Menke *et al.*, 2006; Navas-Acien *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Healey *et al.*, 2009; Yazbeck *et al.*, 2009) e em experimentos animais (Perry *et al.*, 1988; Malvezzi *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2007; Roncal *et al.*, 2007; Massó *et al.*, 2007). A exposição ao chumbo está relacionada com alterações vasculares (Marques *et al.*, 2001; Shelkovnikov *et al.*, 2001; Heydari *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007, 2009) e cardíacas (Vassallo *et al.*, 2007, Fiorese e colaboradores, 2008).

Acredita-se que a patogênese da toxicidade do chumbo no sistema cardiovascular seja multifatorial, por: afetar diretamente a atividade de enzimas e a síntese de proteínas ao se ligar ao grupamento sulfidril (-SH) destas moléculas; reduzir, competitivamente, a absorção de minerais; alterar a homeostasia do cálcio; modificar fatores humorais (Ercal *et al.*, 2001).

O efeito tóxico desse metal está relacionado com alterações no sistema renina-angiotensina (Carmignani *et al.*, 1999; Sharifi *et al.*, 2004) no estresse oxidativo (Vaziri *et al.*, 1997, 2003; Courtois *et al.*, 2003; Farmand *et al.*, 2004; Vaziri *et al.*, 2007), na via do óxido nítrico (Vaziri *et al.*, 1997, 1999; Marques *et al.*, 2001; Carmignani *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007) nos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase-2 (Karimi *et al.*, 2002; Courtois *et al.*, 2003) e na atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (Roger *et al.*, 2005).

### 5.1. CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CHUMBO

O Centers for Disease Control and Prevention (CDC) considera níveis de concentração sanguínea maior ou igual a 10µg/dL excessivas para crianças. Concentrações sanguíneas de chumbo maior ou igual a 30 µg/dL são consideradas elevadas para adultos. Entretanto, a Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) recomenda que em ambientes com exposição ocupacional, os níveis de concentração sanguínea de chumbo não devem

## Discussão

exceder 60µg/dL. No Brasil, de acordo com a norma regulamentadora nº 7 (NR7) do Ministério do Trabalho (1988), os valores de referência de normalidade, o qual apresenta valor próximo de ser encontrado em uma população não-exposta ocupacionalmente e o Índice Biológico Máximo Permitido são respectivamente 40 µg/dL e 60 µg/dL.

Estudos populacionais têm demonstrado um aumento da concentração sanguínea de chumbo em sujeitos ocupacionalmente expostos (variando de 30 à 60µg/dL) (Ehrlich *et al.*, 1998; Bene *et al.*, 2001). Relatos prévios em sujeitos ocupacionalmente expostos na Coréia do Sul mostraram um conteúdo sanguíneo de chumbo de 31,4µg/dL (Glenn *et al.*, 2006). Este estudo indicou que a exposição ao chumbo atua continuamente na pressão arterial sistólica e a redução da exposição pode contribuir para diminuição da pressão arterial. Diversos estudos associam os níveis sanguíneos de chumbo e a hipertensão (Harlan, 1988; Glenn *et al.*, 2003; Navas-Acien *et al.*, 2007).

Neste trabalho, foi encontrada uma concentração sanguínea de chumbo de 9,98 µg/dL, apesar da nossa previsão de uma maior concentração sanguínea de chumbo (~20 µg/dL). Este valor é menor que a concentração considerada limite pela ATSDR (60 µg/dL) em sujeitos ocupacionalmente expostos e pelo Ministério do Trabalho Brasileiro. A razão para esta baixa concentração sanguínea de chumbo (9,98 µg/dL) após sete dias de tratamento se baseia no fato que este metal pesado poderia se depositar em outros sítios orgânicos (tecidos moles e mineralizados).

Mediante estas informações, a importância desse estudo reside no fato de avaliar e tornar mais conhecido o efeito da exposição por sete dias a baixas concentrações de chumbo (9,98 µg/dL) sobre o sistema cardiovascular, mais especificamente sobre a artéria aorta. Dessa maneira, o estudo nos permitiu analisar se a exposição por chumbo em anéis de aorta relaciona-se com alterações na via do óxido nítrico, da ciclooxigenase, na produção de radicais livres e no envolvimento do sistema renina-angiotensina.

Com o intuito de esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na resposta promovida pelo acetato de chumbo, serão discutidos minuciosamente os resultados encontrados em cada protocolo realizado neste trabalho.

## 5.2 EFEITO DO CHUMBO NA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E NA ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) PLASMÁTICA

A Hipertensão Arterial é uma doença crônica, de etiologia multifatorial, considerada como um importante problema de saúde pública por ser um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares (Yazbeck *et al.*, 2009). Estudos prévios demonstram associação entre exposição ao chumbo e desenvolvimento de Hipertensão Arterial em humanos (Glenn, *et al.*, 2003, 2006; Kosnett *et al.*, 2007; Navas-Acien *et al.*, 2008) e em animais (Carmignani, *et al.*, 1999, 2000; Bravo *et al.*, 2007; Grizzo, *et al.*, 2008). Mediante estas informações, tornou-se necessário investigar o efeito da exposição ao chumbo sobre a pressão arterial sistólica (PAS) nesse modelo experimental. No presente estudo, a PAS aumentou significativamente no grupo Chumbo ao final do sétimo dia de exposição.

Em estudos de exposição crônica ao chumbo, através da pletismografia de cauda, foi observado um aumento de PAS em ratos Sprague-Dawley tratados com acetato de chumbo (100ppm em água de beber) durante doze semanas (Vaziri, *et al.*, 1997, 1999, 2003; Ding *et al.*, 1998; Farmand, *et al.*, 2004; Heydari *et al.*, 2006). Perry *et al.* (1988) demonstraram que ratas expostas à 0.1, 1.0 e 5.0 ppm de chumbo em água de beber durante um ano apresentaram aumento de aproximadamente 15 mmHg de PAS quando comparados com grupo Controle.

Malvezzi, *et al.* (2001) mostraram que ratos Wistar expostos ao acetato de chumbo em concentrações maiores (750 ppm em água de beber) por 10 semanas, apresentaram uma concentração sanguínea de chumbo de 67,80 µg/dL e significativo aumento da PAS a partir da 5ª semana quando comparados ao grupo controle. Outro estudo registrou significativo aumento da PAS após o tratamento com acetato de chumbo (5ppm em água de beber) durante trinta dias (Marques, *et al.*, 2001). Karimi *et al.*, (2002) mostraram que ratos Sprague-Dawley expostos ao chumbo por 28 dias através de 100 ppm em água de beber, apresentaram aumento de PAS quando comparados aos seus respectivos grupos controles.

Grizzo *et al.* (2008) expuseram ratas a 100 ppm de chumbo (em água de beber) durante gravidez e lactação. No 22º dia pós-natal, os filhotes foram submetidos à medida de PAS indireta através da pletismografia de cauda. Os resultados demonstraram que a concentração sanguínea de chumbo desses

## Discussão

animais atingiu 58.7 µg/dL. Houve também aumento da PAS do grupo exposto ao metal.

Corroborando com esses dados, Roncal e colaboradores (2007) demonstram que ratos submetidos ao tratamento crônico com 150 ppm de acetato de chumbo na água de beber, por 04 semanas, apresentavam uma concentração sanguínea de chumbo de 26 µg/dL e obtiveram aumento na pressão arterial sistólica.

Estudos prévios relacionam a elevação da pressão arterial em animais expostos ao chumbo com alterações do sistema renina-angiotensina (Boscolo & Carmingnani, 1988; Vaziri *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007; Sharifi *et al.*, 2004). O presente estudo demonstrou aumento da atividade da ECA plasmática nos animais expostos ao chumbo e a significativa correlação entre a PAS e a atividade plasmática da ECA nestes animais. Estes dados nos sugerem a participação do sistema renina-angiotensina como mediador do aumento da PAS em ratos expostos ao chumbo.

Corroborando com nossos achados, Sharifi *et al.*, (2004) observaram significativo aumento da PAS após à segunda semana de tratamento com acetato de chumbo (100 ppm em água de beber). Esse achado foi acompanhado de aumento da atividade sérica e tecidual da ECA na fase inicial (2ª semana) de exposição ao metal. No entanto, na fase crônica (4ª semana) houve supressão da atividade sérica e tecidual dessa enzima. Assim, esses achados provêm fortes evidências acerca do envolvimento da ECA durante as fases iniciais do tratamento com acetato de chumbo. Vale ressaltar que os animais expostos ao chumbo apresentaram ao final da oitava semana uma concentração sanguínea de chumbo de 26,84 µg/dL.

Prévios estudos experimentais sugerem que a exposição crônica com 100ppm de acetato de chumbo, em água de beber, pode contribuir com a hipertensão arterial. Estes estudos mostraram que a concentração de chumbo sanguínea nos ratos tratados variou entre 28,4 µg/dL e 58,7 µg/dL (Gonick *et al.*, 1997; Heydari *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009), valores estes próximos aos observados em trabalhadores ocupacionalmente expostos. Na verdade, pouco se

## Discussão

sabe sobre os efeitos do chumbo na PAS em concentrações sanguíneas inferiores aos valores de referência e nos primeiros estágios de exposição.

Nossos achados concordam com os resultados descritos acima, todavia, diferenças quanto às concentrações de chumbo às quais os animais foram expostos, forma e a duração da exposição devem ser consideradas. Além disso, estes resultados parecem indicar que o efeito do chumbo sobre a pressão arterial é dependente da concentração. Nosso estudo mostrou que o tratamento com acetato de chumbo por sete dias atingiu uma concentração sanguínea de 9,98 µg/dL, inferior ao valor considerado limite pela ATSDR em indivíduos ocupacionalmente expostos (60 µg/dL). Entretanto, esta concentração foi suficiente para elevar a pressão arterial sistólica. A participação do sistema renina-angiotensina poderia ser um dos possíveis mediadores do aumento de PAS.

Além disso, a alteração de pressão arterial sistólica poderia estar associada com as alterações vasculares promovidas pelo tratamento por sete dias com baixa concentração de acetato de chumbo, assim a reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta foi avaliada.

### 5.3 EFEITO DO CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA NA AORTA

No presente estudo, observou-se que, o tratamento por sete dias com acetato de chumbo promoveu uma diminuição, concentração dependente, da reatividade à fenilefrina em anéis de aorta, confirmada pela diminuição da resposta máxima. Resultado semelhante foi encontrado por Zhang *et al.*, (2009) em anéis de aorta de ratos Wistar, expostos a 100 ppm de acetato de chumbo em água de beber por 10 meses. Contudo, este estudo mostrou uma diminuição da reatividade, concentração dependente, a serotonina.

Em contrapartida, estudo prévio realizado por Skoczynska *et al.*, (1986) mostrou que esse metal potencializou a resposta pressora à norepinefrina em artérias isoladas de ratos. Heydari *et al.*, (2006), documentaram que o chumbo (100 ppm em água de beber) foi capaz de aumentar a resposta máxima e a



## Discussão

sensibilidade na presença de fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos tratados com chumbo por um período de 8 a 12 semanas, sendo que esses valores foram mais expressivos no grupo tratado por oito semanas.

Por outro lado, Shelkovnikov *et al.*, (2001); ao estudar os efeitos do acetato de chumbo (concentrações de  $10^{-8}$  até  $10^{-4}$  mol/L) sobre anéis de artéria torácica de ratos com e sem endotélio, não registraram nenhuma mudança na contração evocada pela norepinefrina. Karimi *et al.*, (2002), também não encontraram diferença na sensibilidade e na resposta máxima à fenilefrina de anéis de ratos expostos a 100 ppm de acetato de chumbo (em água de beber) por 28 dias quando comparados ao grupo Controle.

Os resultados conflitantes provavelmente devem-se às baixas concentrações de chumbo às quais os animais foram expostos e também ao baixo tempo de exposição (sete dias). Além disso, estes resultados parecem sugerir que o efeito do chumbo sobre reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta é dependente da concentração e do tempo de exposição.

A modulação endotelial foi avaliada através de um protocolo de reatividade vascular na ausência e na presença do endotélio vascular. De acordo com os resultados, na ausência do endotélio a resposta contrátil à FE foi potencializada nos dois grupos. No entanto, a magnitude dessa resposta, avaliada através da área abaixo da curva, foi maior nos ratos tratados com chumbo. Esse dado associado à diminuição de reatividade vascular à FE sugere que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo esteja liberando um fator de relaxamento derivado do endotélio.

O endotélio funciona como regulador do tônus vascular por liberar substâncias vasoconstrictoras e vasodilatadoras. No entanto, em diversas condições patológicas como na hipertensão arterial, o equilíbrio na liberação dessas substâncias encontra-se alterado (Luscher *et al.*, 1992; Triggle *et al.*, 2003). No presente trabalho pode-se pressupor que há alteração endotelial. Sugere-se que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo pode desencadear um desequilíbrio na síntese, na liberação e/ou no efeito de algum desses mediadores capazes de relaxar ou contrair o músculo liso. Este efeito promovido pelo chumbo poderia contribuir para o decréscimo nas respostas vasoconstrictoras à FE observadas em aortas de ratos.

#### 5.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDÓTELIO.

A partir dos resultados descritos acima, onde há diminuição da reatividade à FE por um desequilíbrio na função endotelial, foi investigado como o chumbo alterava o relaxamento vascular dependente do endotélio. Para isto, foram realizadas curvas concentração-resposta a acetilcolina, que promove relaxamento dependente do endotélio, em anéis de aorta e não foi observada nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Chumbo. Isto sugere que a vasodilatação dependente do endotélio está preservada, ou seja, não alterou a produção de NO estimulada pela acetilcolina.

Resultados semelhantes foram encontrados por Grizzo, *et al.*, (2008), após exposição perinatal de chumbo em aortas de ratos Wistar jovens e por Shelkovnikov *et al.*, (2001), ao estudar os efeitos do acetato de chumbo (concentrações de  $10^{-8}$  até  $10^{-4}$  mol/L) sobre anéis de artéria torácica de ratos Sprague-Dawley.

O relaxamento induzido pela ACh também não foi significativamente diferente quando os anéis de aorta foram incubados *in vitro* com 1ppm de acetato de chumbo por 0.5, 6.0 e 12 horas. Todavia, depois da incubação por 24 horas com chumbo, o relaxamento induzido pela ACh foi menor quando comparado ao Controle (Zhang *et al.*, 2007)

Silveira *et al.*, (2010) encontraram prejuízos na resposta vasodilatadora a acetilcolina após a perfusão do leito caudal de ratos, com 100 $\mu$ M de acetato de chumbo. Em adição, Marques *et al.*, 2001, também observaram prejuízo na resposta vasodilatadora a acetilcolina, nos anéis de aorta de ratos expostos ao chumbo por 30 dias. Essas diferenças entre resultados se devem às baixas doses de chumbo às quais os animais foram expostos e também ao baixo tempo de exposição (sete dias). Além disso, estes resultados sugerem que o efeito do chumbo sobre o relaxamento induzido pela ACh, em anéis de aorta, parece ser dependente da concentração e do tempo de exposição.

Para avaliar se o tratamento por sete dias com acetato de chumbo leva prejuízo no relaxamento do músculo liso vascular, foram realizados experimentos com o nitroprussiato de sódio (NPS). O NPS promoveu resposta vasodilatadora, concentração dependente, semelhante em ambos os grupos experimentais,

## Discussão

sugerindo que a exposição por sete dias ao acetato de chumbo não modificou a capacidade de relaxamento do músculo liso vascular. Resultados semelhantes foram encontrados por Grizzo, *et al.*, (2008), em aortas de ratos jovens expostos ao chumbo durante gravidez e lactação. Zhang *et al.*, (2007) também mostraram que não houve diferença no relaxamento induzido pelo NPS em anéis de aorta incubados por 0.5, 6, 12 e 24 horas com 1ppm de acetato de chumbo. Em adição, Karimi *et al.*, (2002) não observou diferença estatisticamente significativa no relaxamento induzido pelo NPS em ratos tratados com 100 ppm de acetato de chumbo por 28 dias.

Corroborando ainda com nossos resultados, Silveira *et al.*, (2010) encontraram a mesma resposta ao avaliar a integridade do músculo liso vascular após a perfusão 100 $\mu$ M de acetato de chumbo do leito caudal de ratos. Em contrapartida, Marques *et al.*, (2001) observaram prejuízo na resposta vasodilatadora ao NPS, nos anéis de aorta de ratos expostos ao chumbo por 30 dias.

A divergência entre os resultados deve-se às baixas concentrações de chumbo às quais os animais foram expostos e também ao tempo de exposição de sete dias. Em conjunto, os resultados com ACh e o NPS sugerem que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo não modificam as vias de sinalização da guanilato ciclase.

A partir destes resultados, poder-se-ia supor que o chumbo influencia a liberação de fatores vasodilatadores derivado do endotélio. Assim, apesar do relaxamento induzido pela acetilcolina não ter sido prejudicado pelo chumbo, este metal diminuiu a vasoconstrição induzida pela fenilefrina. Os mecanismos pelos quais o chumbo altera a reatividade vascular são pouco conhecidos, principalmente no que se refere aos seus efeitos nos primeiros estágios de exposição e em concentrações muito menores daquelas consideradas seguras para a saúde. Neste sentido, o estudo propôs investigar algumas vias que possivelmente poderiam esclarecer a ação vascular desse metal em anéis de aorta de ratos.

## 5.5 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO CHUMBO SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA

### 5.5.1 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na via do Óxido Nítrico

Considerando os resultados do presente estudo, onde encontramos diminuição da reatividade vascular à fenilefrina nos anéis de aorta de ratos tratados com acetato de chumbo, sem prejuízo no relaxamento dependente do endotélio (ACh), procuramos, por conseguinte, avaliar se a exposição por sete dias a este metal aumentaria os efeitos vasodilatadores do endotélio, através do aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). Dentre os fatores vasoativos derivados do endotélio, o NO é o principal fator relaxante do endotélio que modula as respostas contráteis vasculares a diferentes agonistas (Chatterjee *et al.*, 2008). Assim, com o objetivo de avaliar uma possível participação dessa via, foi realizada uma curva concentração resposta à fenilefrina na presença de L-NAME, um inibidor inespecífico da sintase do NO. Este fármaco, ao inibir a NOS, impede a síntese de NO e, conseqüentemente, a formação de GMPc na célula muscular.

Alterações na via do NO, têm sido extensivamente descritas em estudos experimentais com tratamento de chumbo (Carmingnani *et al.*, 2000; Patrick., 2006; Silveira *et al.*, 2010). Neste estudo, o L-NAME, em anéis tratados com acetato de chumbo por sete dias potencializou a resposta vasoconstrictora à fenilefrina, mas em maior proporção do que no grupo Controle. Estes resultados sugerem que a exposição por sete dias deste metal em anéis de aorta além de diminuir a reatividade vascular, aumenta a modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina por aumentar a biodisponibilidade de NO.

Os resultados deste estudo nos mostram que o relaxamento induzido pela ACh não foi alterado com o tratamento por sete dias com acetato de chumbo, mas ao investigar a liberação basal com L-NAME, houve aumento da biodisponibilidade do NO. Assim, o chumbo não foi capaz de interferir com a capacidade vasodilatadora da ACh, a qual produz relaxamento dependente da estimulação da liberação endotelial de NO. Todavia, esse metal alterou a biodisponibilidade do NO, através da ação do L-NAME.

Resultados funcionais semelhantes foram encontrados por Silveira *et al.*, (2010), na perfusão com 100µM de acetato de chumbo na presença de L-NAME no leito arterial caudal. Entretanto, Karimi *et al.*, (2002), não evidenciaram diferenças na sensibilidade e na resposta máxima à FE nos anéis de aorta de ratos tratados por 28 dias com 100 ppm de chumbo e incubados com L-NAME, quando comparados ao seu respectivo grupo controle.

Corroborando com os dados funcionais, os resultados do presente estudo obtidos pela técnica de Western Blot demonstraram que apesar da expressão da eNOS estar inalterada aos sete dias de exposição ao chumbo, houve um aumento da expressão desta enzima em sua forma fosforilada no resíduo Ser<sup>1177</sup> (p-eNOS) com significativo aumento da razão p-eNOS/eNOS nos animais tratados com acetato de chumbo quando comparados ao controle.

Estudos prévios demonstram a importância da fosforilação da eNOS na regulação da quantidade de NO produzido (Dimmeler *et al.*, 1999; Michel *et al.*, 1999; Michel & Vanhoutte, 2010). Mc Cabe *et al.*, (2000) ao analisar a fosforilação da eNOS, demonstraram aumento do fluxo de elétrons através do domínio reductase desta e, conseqüentemente houve aumento de NO (duas vezes acima do valor basal). A fosforilação da eNOS no resíduo Ser<sup>1177</sup> está associada a um aumento de produção de NO e na ativação da enzima em concentrações muito mais baixas de cálcio/calmodulina do que a eNOS não fosforilada (Dimmeler *et al.*, 1999; Fleming & Busse, 2003). Soma-se a estes achados o aumento de fosforilação do resíduo Ser<sup>1177</sup> acompanhada por aumento da produção de NO em endotélio de veia umbilical humana (Wang *et al.*, 2010). Dimmeler *et al.*, (1999) compararam o potencial de fosforilação de diferentes resíduos Ser e concluíram que o resíduo Ser<sup>1177</sup> exerce papel fundamental na produção de NO, enquanto outro resíduo avaliado (Ser<sup>633</sup>), nenhuma fosforilação foi detectada. Estes dados sugerem a importância da fosforilação da eNOS para sua atividade e produção de NO. Assim, no presente estudo, o aumento desta forma fosforilada poderia ser indicativo de aumento de atividade desta enzima no grupo exposto ao chumbo por sete dias.

Sabe-se que o NO está envolvido nos efeitos vasculares do chumbo, embora os resultados obtidos ainda sejam ambíguos. Estudos prévios demonstram que exposição crônica ao chumbo está relacionada com a diminuição na concentração urinária de NO (Vaziri *et al.*, 1997, 1999, 2003; Ding

## Discussão

*et al.*, 1998; Heydari *et al.*, 2006). Contudo, os achados de Vaziri *et al.*, (2001) relatam aumento na concentração urinária de NO, fato que se coaduna com nossos resultados.

Zhang *et al.*, (2007) avaliaram o efeito do chumbo na produção de NO (através do acúmulo de nitrito) em aortas expostas a 1ppm de acetato de chumbo durante 24 horas. Os resultados mostram que o acúmulo de nitrito foi menor em anéis de aorta expostos ao metal. Vaziri *et al.*, (1999) reportaram que o acetato de chumbo nas concentrações de 10, 30 e 100 µg/dL foi capaz de reduzir a atividade da NOS. Contudo, Gonick *et al.*, (1997), mostraram aumento da atividade da NOS em cérebros de ratos expostos a este metal pesado.

Apesar da maioria destes relatos demonstrarem diminuição da atividade do NO e diminuição da concentração de urinária de NO, estes dados, em sua maior parte, foram obtidos através do tratamento crônico com acetato de chumbo e há uma carência de informações sobre o que ocorreria com NO em uma fase inicial de exposição. É importante ressaltar ainda que as concentrações de chumbo, às quais os animais foram expostos neste estudo, são menores que as consideradas seguras para a saúde, segundo a NR7 Ministério do Trabalho.

Seguindo o propósito de elucidar os mecanismos de ação do acetato de chumbo na via do óxido nítrico, o próximo passo do presente estudo foi avaliar a isoforma induzível de óxido nítrico (iNOS). Relatos prévios mostram que a iNOS está presente em uma variedade de tecidos, principalmente em resposta a mediadores endógenos da inflamação, hipóxia e estresse oxidativo (Chatterjee *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010). Além disso, o aumento da atividade e da expressão da iNOS está bem descrita em doenças inflamatórias como, por exemplo, a hipertensão arterial (Briones *et al.*, 2000; Álvarez *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010).

Para avaliar a isoforma induzível de óxido nítrico (iNOS), foi realizada uma curva concentração resposta à fenilefrina na presença de Aminoguanidina. Na condição controle, a Aminoguanidina (50µM) não alterou a resposta contrátil à fenilefrina. Contudo, na presença desse fármaco, houve aumento de reatividade à fenilefrina no grupo tratado por sete dias com acetato de chumbo. Estes resultados sugerem que a redução de reatividade à FE induzido pelo tratamento com chumbo é, em parte, derivado do aumento da liberação de NO derivado da iNOS.

Somam-se aos dados funcionais, os resultados obtidos pela técnica de Western Blot, onde houve um aumento da expressão iNOS no grupo tratado por sete dias com acetato de chumbo em relação ao grupo Controle. Corroborando com os resultados deste estudo, Gonick *et al.*, (1997) mostraram aumento da expressão da iNOS nos rins de animais tratados por três meses com 100ppm em água de beber.

Outros trabalhos demonstram que apesar da excreção urinária NO estar diminuída em ratos tratados por 12 semanas com 100ppm de acetato de chumbo, houve aumento da expressão de iNOS em aortas e rins destes animais (Vaziri *et al.*, 1999) e em aortas e corações de ratos tratados com a mesma concentração e tempo de exposição citadas anteriormente (Vaziri *et al.*, 2001). Todavia, Zhang *et al.*, (2007), não encontraram diferenças na expressão protéica da iNOS de aortas de ratos incubados por 24hs com 1ppm de acetato de chumbo.

Partindo do propósito que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo diminuiu a reatividade vascular e aumentou a biodisponibilidade de NO, sendo que parte deste parecendo ser derivado da iNOS, poder-se-ia supor na atuação desse metal nos canais para  $K^+$  do músculo liso vascular.

#### **5.5.2 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre os canais para $K^+$ .**

Sabe-se que uma das vias de vasodilatação do NO pode envolver a ativação de canais para  $K^+$ . (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2009; Félétou, 2009). Bolontina *et al.* (1994) demonstraram esse resultado em aortas de coelhos. Mediante essas considerações, para avaliar a via de ativação dos canais para  $K^+$  foi utilizado o TEA, um inibidor inespecífico dos canais para  $K^+$ .

A incubação com o TEA aumentou a resposta contrátil à fenilefrina em ambos os grupos experimentais. Contudo, a magnitude desta resposta foi maior no grupo tratado por sete dias com acetato de chumbo. Estes resultados sugerem que uma das vias de sinalização que reduzem a reatividade vascular induzida por esse metal envolve a ativação canais para  $K^+$ .

Rossoni et al, (2002) demonstraram hipertensão e aumento da biodisponibilidade de NO em ratos tratados com ouabaína. Nesse trabalho, protocolo com TEA potencializou a resposta vasoconstrictora à fenilefrina em anéis de ratos tratados com OUA em maior proporção do que no grupo controle. Os resultados deste autor sugerem que o aumento do NO mediado por este tratamento poderia estar ativando canais para  $K^+$ . No presente estudo, o aumento do NO mediado pela exposição ao chumbo poderia estar ativando canais para  $K^+$ .

Sete dias de exposição ao chumbo aumentou a PAS, apesar de diminuir a reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta, pelo aumento da biodisponibilidade de NO. Um fator que poderia estar contribuindo para o aumento da PAS e do NO é a angiotensina II. Estudo prévio demonstra que a Angiotensina II estimula a produção de NO em células endoteliais de aorta (Pueyo et al., 1998). Além disso, existem trabalhos que demonstram que o chumbo ativa a enzima conversora da angiotensina (ECA) (Sharifi et al., 2004), além de aumentar a atividade plasmática da renina, por estimular a síntese e liberação da mesma pelo aparelho justaglomerular (Boscolo & Carminghani, 1988; Carminghani et al., 1999).

Baseado nesses dados especulou-se sobre a participação do sistema renina angiotensina nesse modelo experimental. De fato, neste trabalho, foi possível observar um aumento da atividade da ECA plasmática, que poderia estar participando do aumento da PAS após o tratamento por sete dias com acetato de chumbo.

### **5.5.3 Participação da Angiotensina II local sobre o efeito do chumbo na resposta contrátil à fenilefrina**

A interação entre os diferentes componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona determina sua atividade e influencia a regulação da pressão arterial, balanço renal de sódio e risco cardiovascular (Lacolly et al., 2009). Dentre os componentes do SRAA, a angiotensina II exerce efeito predominante no tônus vascular, mediado via interação com o receptor de angiotensina do subtipo 1 ( $AT_1$ ) do músculo liso vascular (Griendling et al., 1996;



## Discussão

Rajagopalan *et al.*,1996). A angiotensina II exerce numerosos efeitos no sistema cardiovascular, entre eles: vasoconstricção, crescimento de células do músculo liso celular, hipertrofia miocárdica, fibrose, disfunção endotelial e inflamação vascular (Rajagopalan *et al.*,1996). Além disso, a angiotensina II contribui para hipertensão arterial via seu efeito central, vascular e renal.

A angiotensina II também é considerada como importante mediador do estresse oxidativo vascular, sendo esta uma potente ativadora da NAD(P)H oxidase, liberando radicais livres (Rajagopalan *et al.*,1996; Doughan *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2008; Garrido & Griendling, 2009).

Mediante estas informações, foi investigado no presente estudo a participação da angiotensina II em ratos expostos ao chumbo por sete dias. Assim, os segmentos de aorta foram incubados com enalapril, para bloquear a ECA, e conseqüentemente, reduzir a formação de angiotensina II. Este fármaco promoveu redução da resposta contrátil à FE somente nos anéis tratados com chumbo. Pode-se deduzir que esse metal é capaz de estimular a atividade da ECA endotelial e promover aumento de angiotensina II local para interagir com os receptores do subtipo AT<sub>1</sub> no músculo liso vascular.

Desta forma, para investigar a participação da angiotensina II local, no tratamento por sete dias com acetato de chumbo, foi utilizado um antagonista do receptor AT<sub>1</sub>, o losartan. Assim como o enalapril, o losartan reduziu a resposta contrátil à FE no grupo exposto chumbo. No grupo Controle, este fármaco não alterou a reatividade. Não houve diferença na expressão protéica dos receptores AT<sub>1</sub> entre o grupo Controle e Chumbo. Pode-se sugerir que esta resposta não foi ocasionada pelo aumento do número de receptores AT<sub>1</sub>, pois a expressão deste receptor não foi alterada pela exposição ao chumbo por sete dias.

Somam-se a estes achados, o aumento da ECA plasmática nos animais expostos ao chumbo e a significativa correlação entre a PAS e a atividade plasmática da ECA nestes animais. Estes dados nos sugerem a participação local e sistêmica do sistema renina-angiotensina como mediador dos efeitos do chumbo no aumento da PAS.

O presente estudo corrobora com os dados encontrados por Silveira *et al.*, (2010), que mostrou que o acetato de chumbo pode aumentar a atividade da ECA no leito arterial caudal de ratos Wistar. Em adição a estes resultados, Sharifi *et al.*,

## Discussão

2004 demonstraram aumento da atividade sérica e tecidual da ECA na fase inicial (2ª semana) de exposição ao acetato de chumbo.

Diversos mecanismos tais como alterações nos fatores humorais, no trocador de sódio/cálcio, inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, têm sido descritas para explicar a hipertensão induzida pelo chumbo e sua etiologia não é bem esclarecida. Estudos prévios relacionam a elevação da pressão arterial em animais expostos ao chumbo com alterações do sistema renina-angiotensina (Boscolo & Carminghani, 1988; Vaziri *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007; Sharifi *et al.*, 2004). Exemplificando estes relatos, várias pesquisas demonstraram que a exposição crônica ao chumbo aumenta a atividade plasmática da renina, por estimular a síntese e liberação da mesma pelo aparato justaglomerular (Boscolo & Carminghani, 1988; Carminghani *et al.*, 1999). Entretanto, outros pesquisadores não encontraram diferenças na atividade da renina plasmática entre o grupo controle e o exposto ao metal por sete semanas (Skoczynska, 1995). Já Vicery *et al.*, (1982) mostraram redução da renina plasmática, bem como, diminuição da concentração de angiotensina II.

Os resultados descritos acima foram, em sua maioria, obtidos através do tratamento crônico com acetato de chumbo e há uma carência de informações sobre qual seria a participação do sistema renina-angiotensina em uma fase inicial de exposição. No presente estudo, a exposição por sete dias ao acetato de chumbo aumentou a atividade do sistema renina-angiotensina. A participação desse sistema poderia ser um dos possíveis mediadores do aumento da PAS. Apesar do envolvimento local do sistema renina-angiotensina neste modelo experimental, os efeitos vasodilatadores do NO foram mais significantes e contribuíram para a redução da reatividade vascular à fenilefrina. Além disso, nossos resultados sugerem que a angiotensina II poderia aumentar a biodisponibilidade do NO.

Estudos recentes têm demonstrado que alterações da liberação de angiotensina II local e dos prostanóides vasoconstritores aumentam a liberação de EROs em aorta de ratos normotensos (WKY) e espontaneamente hipertensos (SRH) (Alvarez *et al.*, 2005). Em adição, Griendling *et al.*, (1994, 2000), documentaram que a angiotensina II foi capaz de aumentar as espécies reativas de oxigênio derivadas da NADPH oxidase. Assim, especulou-se sobre a participação desta via no aumento da liberação de radicais livres.

#### 5.5.4 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na via dos radicais livres

O estresse oxidativo pode afetar a reatividade vascular por diferentes mecanismos. As EROs funcionam como segundo mensageiros, ativando numerosas moléculas sinalizadoras e desempenham um papel importante na fisiopatologia vascular (Touyz & Schiffrin, 2004, 2008; Alvaréz *et al.*, 2008). Além disso, o stress oxidativo está envolvido na patogênese da arteriosclerose, acometimentos neurodegenerativas, câncer e muitas outras desordens incluindo a hipertensão arterial (Vaziri & Khan, 2007).

O ânion superóxido é produzido por uma variedade de enzimas, incluindo xantina oxidase, ciclooxigenase e a NADPH oxidase. Esta última desempenha maior função nas células vasculares (Kawashima & Yokorama, 2010). Está bem estabelecida que a NADPH oxidase é a principal fonte vascular de  $O_2^-$  (Harrison & Gongora, 2009; Griending *et al.*, 2000; McIntyre *et al.*, 1999). Hamilton *et al.* (2002) estudaram inibidores da NADPH oxidase, e demonstraram que a apocinina foi o composto com maior potencial para reduzir a produção de  $O_2^-$ . Estes pesquisadores demonstraram que o tratamento com apocinina em artérias isoladas de ratos diminuiu a produção de radicais livres estimulados pela NAD(P)H oxidase e aumentou a biodisponibilidade de NO, resultados semelhantes foram encontrados em artérias e veias de humanos.

Deste modo, a apocinina, foi utilizada para avaliar a via dos radicais livres no tratamento de sete dias com acetato de chumbo. O presente estudo demonstrou que este fármaco reduziu a reatividade vascular à fenilefrina nos segmentos arteriais expostos ao tratamento por chumbo. No entanto, na situação controle a apocinina não alterou a reatividade vascular. Portanto esse resultado sugere que a enzima NADPH oxidase estaria estimulada na presença do chumbo, liberando, assim mais radicais livres.

Ainda com a finalidade de investigar a participação do  $O_2^-$ , no tratamento de sete dias com acetato de chumbo foram realizadas curvas-concentração resposta a fenilefrina com a SOD, um seqüestrador do ânion superóxido. A SOD dismuta o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio e reduz os efeitos tóxicos do ânion superóxido (Touyz & Schiffrin, 2004).

Na condição controle, a SOD não alterou a sensibilidade e a resposta máxima. Contudo, nos ratos tratados com chumbo a resposta máxima foi reduzida. Pode-se especular, através deste resultado, que parece existir uma presença maior de  $O_2^-$  nos anéis expostos ao metal.

Outras EROs, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), atuam estimulando a proliferação e migração celular e estão relacionadas com efeito hipertrófico nos vasos (Harrison & Gongora, 2009).

A participação do  $H_2O_2$  na resposta contrátil à fenilefrina foi avaliada através da catalase, um “varredor” do  $H_2O_2$ . Esta enzima não modificou a resposta vascular à fenilefrina no grupo controle, contudo no grupo exposto ao chumbo houve redução da reatividade vascular. Estes dados sugerem a presença de  $H_2O_2$  nos anéis tratados com chumbo por sete dias.

Somam-se aos resultados funcionais, os resultados obtidos pela técnica de quimioluminescência dependente de Lucigenina ( $QL_{Luc}$ ) e fluorescência emitida por dihidroetídio, o quais demonstraram aumento da produção de  $O_2^-$  nos anéis de aorta dos animais expostos por sete dias ao acetato de chumbo quando comparados aos animais controle.

Em acordo com os resultados acima, Courtois *et al.* (2003) documentaram maior produção de EROs em culturas de células endoteliais na presença de chumbo (1ppm) por 24 horas. Somam-se a esses achados, trabalhos prévios realizados por Vaziri *et al.* (1997) e Ding *et al.* (2000); que registraram aumento da peroxidação lipídica e maior produção de  $OH^-$  no animais expostos a este metal. Outros estudos mostraram o aumento do estresse oxidativo em ratos expostos cronicamente ao chumbo, através da concentração plasmática de malondialdeído (MDA) (Gonick *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 1998;).

Vaziri *et al.* (1999) relataram pela técnica de Western Blot a geração de nitrotirosina (a qual envolve a oxidação do NO mediada pelas EROs) no cérebro, rim, fígado e coração de ratos tratados por 12 semanas com 100ppm em água de beber.

Contrapondo estes resultados, estudo prévio em nosso laboratório demonstrou que o acetato de chumbo (100 $\mu$ M) não agiu sobre a via de produção e/ ou liberação de  $O_2^-$  no leito arterial caudal (Silveira *et al.*, 2010).

Em adição aos nossos dados, trabalhos realizados em humanos observaram envolvimento das EROs sobre o efeito do chumbo. Ni *et al.*, (2004),

por exemplo, reportaram que o chumbo foi capaz de gerar  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  em cultura de células endoteliais e do músculo liso das artérias coronárias de humanos.

Como demonstrado no presente trabalho, o tratamento com chumbo por sete dias reduziu a reatividade vascular à FE e aumentou a biodisponibilidade de NO. Pode-se considerar, que parte deste NO é derivado da iNOS. Nota-se também, a participação do sistema renina-angiotensina que associado ao aumento da liberação de angiotensina II local poderiam ativar a NADPH oxidase e consequentemente aumentar as EROs. Entretanto, vale ressaltar que os efeitos vasodilatadores do óxido nítrico se sobrepuseram ao aumento de EROs.

Baseado no aumento da liberação local e sistêmica da angiotensina II, e no aumento de radicais livres foi realizado outro protocolo para avaliar a participação dos prostanóides derivados da COX na ação vascular chumbo. Além disso, os resultados do presente estudo mostram diminuição de reatividade vascular, e deste modo, as prostaciclínas poderiam estar envolvidas nesta resposta.

#### **5.5.5 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre os prostanóides derivados da ciclooxigenase**

Os metabólitos da ciclooxigenase modulam alguns efeitos no sistema vascular como: vasodilatação (prostaciclínas) e vasoconstricção ( $PGH_2$  e  $TXA_2$ ) (Karimi *et al.*, 2002; Antman *et al.*, 2005). Alguns estudos sugerem o efeito do chumbo no metabolismo do ácido araquidônico (Karimi *et al.*, 2002; Courtois *et al.*, 2003; Grizzo *et al.*, 2008; Silveira *et al.*, 2010).

Visando avaliar a via do ácido araquidônico-ciclooxigenase, após sete dias de exposição ao chumbo, os segmentos de aorta foram incubados com a indometacina, um inibidor não seletivo da enzima COX. Os resultados demonstraram que este fármaco não alterou a resposta em ambos os grupos experimentais. Baseado no fato do tratamento por sete dias com chumbo aumentar a biodisponibilidade de NO, pode-se supor que este aumento de NO poderia mascarar alguma resposta vasoconstrictora desta via. Por isso foi realizado o protocolo de co-incubação indometacina/ L-NAME. Este protocolo potencializou a resposta vasoconstrictora à fenilefrina em anéis tratados com

## Discussão

acetato de chumbo por sete dias em maior proporção do que no grupo controle. Todavia, não houve diferença da dAUC entre os grupos  $Pb^{+2}$  L-NAME e  $Pb^{+2}$  Indometacina + L-NAME. Estes dados sugerem que os prostanóides derivados via do ácido araquidônico não participam das respostas vasculares à FE em segmentos de aorta expostos por sete dias ao acetato de chumbo.

Em contraposição com nossos dados, Grizzo *et al.*, (2008), demonstraram que a incubação com indometacina em anéis expostos ao chumbo causou significativa diminuição no  $pD_2$ , mas não alterou a resposta máxima. Karimi *et al.*, (2002) mostrou diminuição da reatividade vascular à FE em anéis incubados com indometacina em ambos os grupos experimentais. Entretanto, este decréscimo foi maior no grupo exposto ao metal. Estes autores sugerem a participação da via da ciclooxigenase em ratos expostos ao chumbo por 28 dias. Em adição, Courtois *et al.*, (2003) registraram aumento da expressão da isoforma da COX-2 em anéis de aorta perfundidos com chumbo. Estudo prévio em nosso laboratório mostrou o envolvimento de prostanóides vasoconstrictores derivados da COX no leito arterial caudal de ratos perfundidos com chumbo ( $100\mu M$ ) (Silveira *et al.*, 2010)

A divergência entre os resultados encontrados no presente estudo com aqueles descritos acima se devem às baixas concentrações de chumbo às quais os animais foram expostos e também ao tempo de exposição de sete dias.

## 5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A EXPOSIÇÃO POR SETE DIAS AO ACETATO DE CHUMBO.

A atividade humana tem provocado cada vez mais contaminações ambientais que tem exposto os homens a vários tipos de agentes tóxicos, entre eles, o chumbo. A exposição humana a este metal seja ela ocupacional, por fundição primária desse metal, reciclagem de baterias, indústrias de pigmentos e no setor eletro-eletrônico (solda e ligas), são muito comuns e ainda não são bem conhecidas as consequências sobre a saúde.

A importância deste estudo reside no fato de que os resultados encontrados permitam compreender melhor os mecanismos pelos quais o chumbo exerce efeito tóxico sobre o sistema cardiovascular. Além disso, deve ser

ressaltada a importância do modelo experimental utilizado. Foi desenvolvido um modelo experimental de exposição controlada com acetato de chumbo por sete dias. Ao término do tratamento, o conteúdo sanguíneo atingiu 9,98 µg/dL de chumbo. Este valor é inferior aos níveis sanguíneos permitidos pelo Ministério do Trabalho (60 µg/dL) em indivíduos ocupacionalmente expostos. Entretanto, este conteúdo sanguíneo foi suficiente para elevar a pressão arterial sistólica e promover alterações vasculares. Isto nos permite sugerir uma revisão dos valores de conteúdo sanguíneo de chumbo considerados seguros em humanos.

Os resultados do presente estudo revelam que a exposição por sete dias ao acetato de chumbo aumentou a PAS e diminuiu a reatividade vascular à FE em anéis de aorta de ratos. Os efeitos desse metal são dependentes do endotélio e envolvem o aumento da biodisponibilidade do NO, parte deste parecendo ser derivado da iNOS. O aumento do NO mediado por esse tratamento poderia estar ativando canais para K<sup>+</sup>. Soma-se a estes achados, a participação do sistema renina-angiotensina como um dos possíveis mediadores do aumento de PAS. O aumento da atividade da ECA associada ao aumento da liberação de angiotensina II local poderiam ativar a NADPH oxidase e consequentemente aumentar as EROs. Todavia, vale ressaltar que os efeitos vasodilatadores do óxido nítrico foram maiores, mascarando os efeitos vasoconstrictores da angiotensina II e dos radicais livres.

De fato, os resultados deste estudo ajudaram a esclarecer os efeitos tóxicos e os mecanismos pelos quais o chumbo atua no sistema cardiovascular. Além disso, estes resultados geraram respostas que precisam ser esclarecidas posteriormente.

## 6 CONCLUSÃO

O modelo experimental utilizado neste estudo apresentou, ao término do sétimo dia, baixas concentrações sanguíneas de chumbo, concentrações essas inferiores às consideradas limite pela ATSDR e permitidas pelo Ministério do Trabalho Brasileiro.

Nesse modelo experimental, o chumbo, em baixa concentração, alterou os níveis de pressão arterial sistólica e a reatividade vascular. A participação do sistema renina-angiotensina poderia ser um dos possíveis mediadores do aumento de PAS. No entanto, houve redução da reatividade vascular que pode ser compensatória ao aumento de PAS. Essa diminuição da reatividade à FE é mediada pelo endotélio e está associada ao aumento da biodisponibilidade de NO, sendo que parte deste parece ser derivado da iNOS. Corroboram com esses dados o aumento da expressão protéica da iNOS e da p-eNOS no resíduo Ser<sup>1177</sup>, com significativo aumento da razão p-eNOS/eNOS após exposição ao metal. Além disso, o aumento de NO mediado por esse tratamento poderia estar ativando canais para K<sup>+</sup>.

Somam-se a esses resultados, o aumento da liberação de angiotensina II local que poderia ativar a produção de NO, contribuindo para redução da reatividade vascular. Além disso, a angiotensina II poderia ativar também a NADPH oxidase e consequentemente aumentar as EROs. Apesar do envolvimento do sistema renina-angiotensina e das EROs nesse modelo experimental, vale ressaltar que os efeitos vasodilatadores do NO foram mais expressivos e contribuíram para redução da reatividade vascular à FE em anéis de aorta.

Em suma, os resultados do presente estudo demonstram que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo aumenta a PAS e promove alterações vasculares, reforçando a hipótese de que esse metal deve ser considerado um fator de risco para doenças cardiovasculares.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for lead. US Department of Health and human services, Public Health Service, Atlanta, 1993. Annual Report. 1995; 307p.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for lead. US. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, 2005.

Alvaréz Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaceis M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *Journal of Hypertension*. 2005; 23(4):767-777.

Alvaréz Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaceis M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *British Journal of Pharmacology*. 2008; 153:926-935.

Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide syntases. *Cardiovascular Research*. 1999; 43:521-531.

Angeli JK. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. 2009.113f. Tese de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

Antmam EM, DeMets D, Loscalzo J. Ciclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation*. 2005; 112: 759-770.

Bakris GL, Mesah GA. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiological Clinical*. 2002; 20: 195-206.

Barth A, Schaffer AW, Osterode W, Winker R, Konnaris C, Valic E. Reduced cognitive abilities in lead-exposed men. *International Archives of Occupational and Environmental health*.2002; 75: 394-398.

Beal MF, Serial review: Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002; 32(9): 797-803.

Beltrán AE, Briones AM, Garcia-Redondo AB, Rodríguez C, Miguel M, Álvarez Y. Alonso MJ. Martínez-González J, Salaices M. p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *Journal of Hypertension*.2009; 27: 141-154.

Bene A, Obineche E, Gillet M, Pasha MAH, Bishawi B. Association between blood levels of lead, blood pressure, and risk of diabetes and heart disease in workers. *International Archives of Occupational and Environmental health*.2001; 74: 375-378.

Bergdahl IA, Schutz A, Gerhardsson L, Jensen A & Skerfving S. Lead concentrations in human plasma, urine and whole blood. *Scandinavian Journal of Work and Environmental Health*.1997; 23: 359-436.

Bohr DF, Webb RC. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension.*American Journal of Medicine*.1984; 77: 3-16.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. *Nature*.1994; 368: 850-853.

Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T. Mechanism of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery.*Journal Physiology*.1984; 351: 594-572.

Borja-Aburto VH, Hertz-Piccioto I, Lopez MR, Farias P, Rios C, Blanco J. Blood lead levels measured prospectively and risk of spontaneous abortion. *American Journal of Epidemiology*.1999; 150: 590-597.

Boscolo P, Carmingnani M. Neurohumoral blood pressure regulation in lead exposure. *Environmental Health Perspectives*.1988; 78: 101-109.

Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*.1976; 72: 248-254.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 20 estabelece a classificação das águas e os níveis de qualidade exigidos. 2001. Disponível em: <<http://www.mma.gov/por/conama>. Acesso em: 14/05/10.

BRASIL. Ministério do Trabalho. *Norma Regulamentadora nº 7*. In: Pimenta A L & Capistrano FD, org. Saúde do trabalhador. Hucitec: São Paulo; 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao chumbo metálico. Saúde do trabalhador*. Protocolos de complexidade diferenciada. Normas e manuais técnicos. Brasília. Editora do Ministério da Saúde; 2006.

Bravo Y, Quiroz Y, Ferrebuz A, Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. Mycophenolate mofetil administration reduces renal inflammation, oxidative stress, and arterial pressure in rats with lead-induced hypertension. *American Journal Renal Physiology*.2007; 293: 616-623.

Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Balfagon G, Salaceis M. Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in the mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology*.2000; 131(2): 185-194.

Buñang RD. Validation in a awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *Journal Applied Phisiology*.1973; 34(2): 279-82.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidative stress. *Circulation Research*.2000; 87:840-844.

Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular. Research*. 2005; 68: 26-36.

Cannon III RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry*.1998; 44(8): 1809-1819.

Carmingnani M, Boscolo P, Poma A, Volpe AR. Kininergic system and arterial hypertension following chronic exposure to inorganic lead.*Immunopharmacology*.1999; 44 (1-2):105-110.

Carmingnani M, Volpe AR, Boscolo P, Qiao N, Gioacchino MD, Grilli A, Felaco M. Catcholamine and oxide nitric systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sciences*.2000; 68: 401-451.

Carvalho FM, Silvany-Neto AM, Lima MEC, Tavares TM, Waldron HA. Lead poisoning among children from Santo Amaro, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 1985; 19: 165-175.

Carvalho FM, Silvany-Neto AM, Tavares TM, Costa ACA, Chaves CR, Nascimento LD, Reis MA. Chumbo no sangue de crianças e passivo ambiental de uma fundição de chumbo no Brasil. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2003; 13:19-23.

de Capitani EM, Paoliello MMB, Costa de Almeida GR. Fontes de exposição humana de chumbo no Brasil. *Medicina*.2009;42(3):301-308.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC).2005. Blood lead levels- United States, 1999-2002.*MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep*.54:513-516.

Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular Pharmacology*. 2008; 49: 134-140.

Conterato GMM. *Efeitos do chumbo sobre a atividade da Tio redoxina Redutase Citosólica (TrxR1) e parâmetros de estresse oxidativo em rins de ratos*. 2007. 70 f. [Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica)] – Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

Cordeiro R, Lima Filho EC, Salgado PET. Distúrbios neurológicos em trabalhadores com baixos níveis de chumbo no sangue I: Neuropatia periférica. *Revista de Saúde Pública*. 1996; 30: 248-55.

Courtois E, Marques M, Barrientos A, Casado S, Lopes-Farré A. Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003; 14: 1464-1470.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappel MC, Barkx H, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002; 417: 822-828.

Cruzado MC, Risler NR, Miatello RM, Yao G, Schiffrin EL, Touyz M. Vascular smooth muscle cell NA(P)H oxidase activity during the development of hypertension: Effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *American Journal of Hypertension*. 2005; 18: 81-87.

da Cunha V, Souza HP, Rossoni LV, França AS, Vassallo DV. Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*. 2000; 39(1): 124-130.

Davidge ST. Prostaglandin H syntase and vascular function. *Circulation Research*. 2001; 89: 650-660.

Diertert RR, Piepenbrink MS. Perinatal immunotoxicity: why adult exposure assessment fails to predict risk. *Environmental Health Perspectives*.2006; 114: 477-483.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM, Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999; 399: 601-605.

Ding Y, Vaziri ND, Gonick H. Lead-induced hypertension. II response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase and nitroprusside. *Environmental Research*.1998; 76:107-113.

[DNPM] Departamento Nacional de Produção Mineral, *Sumário Mineral*; 2001. Disponível em:<<http://www.dnpm.gov.br/sm2001.html>>. Acesso em 14/mai/2010.

\_\_\_\_\_.Departamento Nacional de Produção Mineral, *Sumário Mineral*; 2007. Disponível em:< <http://www.dnpm.gov.br/sm2010.html>>. Acesso em: 14/ mai/ 2010.

\_\_\_\_\_.Departamento Nacional de Produção Mineral, *Sumário Mineral*; 2009. Disponível em:< <http://www.dnpm.gov.br/sm2010.html>>. Acesso em: 17/ mai/ 2010.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. DBH VI. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2010; 17(1):4.

Doughan A, Harrison DG, Dikalov SI.Molecular Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Mitochondrial Dysfunction. *Circulation Research*.2008; 102: 488-496.

Dreher D, Jundon AF.Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *Journal Cellular of Physiology*.1995; 162:147–153.

Ehrlich R, Robins T, Jordaan E, Miller S, Mbuli S, Selby P, Wynchank S, Cantrell A, De Broe M, D' Haese P, Todd A, Landrigan P. Lead absorption and renal

dysfunction in South African battery factory. *Occupational and Environmental Medicine*.1998; 55: 453-460.

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress. Part 1. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2001: 529-539.

Fanning D. A mortality study of lead workers,1926-1985. *Archives Environmental Health*.1988; 43(3):247-5.

Farmand F, Ashkan E, Roberts CK, Sindhu, RK.Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environmental Research*.2005; 98:33-39.

Féléto M, Calcium- activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *British Journal of Pharmacology*.2009; 159:545-562.

Féléto M, Vanhoutte PM. EDHF: an Updade. *Clinical Science*.2009; 117:139-155.

Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelium- Derived hyperpolarizing factor(s) hiperolarize(s) coronary smooth muscle. *The Phisiologist*.1985; 48:325.

Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelium- Derived hyperpolarizing factor. Where are we now? *Arteriosclerosis, Thromosis and Vascular Biology*.2006; 26: 1215-1225.

Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelium- dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Britisth Journal of Pharmacology*.1988; 93:515-24.

Féléto M, Vanhoutte PM.The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization.*Journal Physiology Pharmacology*.1999; 50(4):525-34.

Fiorese M, Efeitos da exposição aguda ao acetato de chumbo sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos. 2008. 94f. Tese de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

Fleming I, Busse R. NO: the primary EDHF. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.1999; 31: 5-14.

Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide syntase. *American Journal Regulatory and Integrative Comparative Physiology*.2003; 284: 1-12.

Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension.*Physiological Review*.1982; 62: 347-504.

Forstermann U,Closs EL, Pollock JS, Nakane M, Schwartz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide syntase isozymes.Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*.1994; 23: 1121-1131.

Forstermann U, Munzel T, Endothelial nitric oxide syntase in vascular disease. From Marvel to menace. *Circulation*.2006; 113: 1708-1714.

Freis ED. Age, race, and sex and other indices of risk in hypertension. *American Journal of Medicine*.1973; 55: 275-280.

Frolish JC, Forstermann U, Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. Advanced Prostaglandin.*Tromboxane and leukotriene research*.1989; 19:211-215.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*.1980; 288: 373-6.

Garrido AM, Griendling KK.NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*.2009; 302: 148-158.



Glenn SB, Roche KB, Lee BK, Weaver VM, Told AC, Schwartz BS. Changes in systolic blood pressure associated with lead in blood and bone. *Epidemiology*.2006; 17: 538-544.

Glenn SB, Stewart WF, Links JM, Told AC, Schwartz BS. The longitudinal association of lead with blood pressure. *Epidemiology*.2003; 14 (1): 30-36.

Gonick HC, Ding Y, Steven CB, Zhenmin N, Vaziri ND. Lead Induce Hypertension. Interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. *Hypertension*.1997; 30 (6) 1487-1492.

Gonik HC. Nephrotoxicity of cadmium & lead. *The Indian Journal Medicine Research*.2008; 128: 335-352.

Goyer RA. Toxic effects of metals – Lead, pp. 639-646. In Mary O. Amdur, J.D.; Curtis D.K. *Casareh and Doull's toxicology – the basic science of poisons* 1991; Editora Pergamon Press, USA, 1991.

Gonzalez-Cossio T, Peterson KE, Sanín L, Fishbein SE, Palazuelos E, Aro A. Decrease in birth weight in relation to maternal bone lead burden. *Pediatrics*.1997; 100: 856-862.

Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*.2003; 108: 1912-1916.

Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annual Review Pharmacology Toxicology*.1996; 36: 281-306.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NAD(P)H oxidase activity in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*.2000; 86: 494-501.

Griendling KK, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in Cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*.1994; 74: 1141-1148.

Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regulatory Peptides*.2000; 91: 21-27.

Grizzo LT, Cordelline S. Perinatal exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicological Sciences*.2008; (1): 207-214.

Harlan WR. The relationship of blood lead levels to blood pressure in the U.S. population. *Environmental Health Perspectives* .1988; 78:9-13.

Hall JE. Historical Perspective of the rennin- angiotensin system.*Molecular Biotechnology*.2003; 24: 27-38.

Hamilton CA, Brosnam MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczack AF. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension*.2002; 40: 755-762.

Hannken T, Schroeder R, Stahl RAK, Wolf G. Angiotensin II- mediated expression of p27kip1 and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of the oxygen radicals. *Kidney International*.1998; 54: 1923-1933.

Harrap SB. Hypertension: genes versus environmental. *Lancet*.1994; 334 (8916): 169-171.

Harrison DG, Gongora MC. Oxidative stress and hypertension. *The Medical Clinics of North America*.2009; 93: 621-635.

Healey N, Lead Toxicity, Vulnerable subpopulations and emergency preparedness. *Radiation Protection Dosimetry*.2009; 134 (3-4): 143-151.

Hernandez-Avila M, Peterson KE, Gonzalez-Cossio T, Sanin LH, Aro A, Schnaas L. Effect of maternal bone lead on length and head circumference at birth. *Archives Environmental Health*. 2002; 57: 482-488.

Heydari A, Norouzzadeh A, Khoshbaten A, Asgari A, Ghasemi A, Nafafi S, Badalzadeh R. Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicology Letters*. 2006; 166: 88-94.

Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan RG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiological Reviews*. 1996; 76 (4): 967-1003.

IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Inorganic and organic lead compounds. Volume-87 (Genova: World Health Organization Press). 2006.

[ILZSG]. [International Lead and Zinc Study Group] *Statistic Lead and Zinc*; 2001. Disponível em: <<http://www.ilzsg.org/statistics.asp>>. Acesso em 13/mai/2010.

[ILZSG]. [International Lead and Zinc Study Group] *Statistic Lead and Zinc*; 2007. Disponível em: <<http://www.ilzsg.org/statistics.asp>>. Acesso em 13/mai/2010.

[IUPAC] Commission on Atomic Weights and isotopic Abundances report for the International Union of Pure and Applied Chemistry in Atomic Weights of the Elements. 2001. *Pure and Applied Chemistry*. 2003. 75: 1107-1122.

Karimi G, Khoshbaten A, Abdollahi M, Sharifzadeh M, Namiranian K, Dehpour RA. Effects of subacute lead acetate administration on nitric oxide and cyclooxygenase pathways in rat isolated aortic ring. *Pharmacological Research*. 2002; 46 (1): 31-37.

Kasperczyk S, Kasperczyk A, Ostalowska A, Dziwiesz M, Birkner E. Activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, and lipid peroxidation in erythrocytes in workers exposed to lead. *Biological Trace Element Research*. 2004; 102(1-3):61-72.

Kawabe J, Fumitaka U, Naoyuk H. Prostacyclin in Vascular Diseases. *Circulation Journal*.2010; 74: 837-843.

Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*.2004; 24: 998-1005.

Kerr S, Brosnan J, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: Role of endothelium. *Hypertension*.1999; 33: 1353-1358.

Khalil-Manesh F, Gonik HC, Weiler EW, Prins B, Weber MA, Purdy RE. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *American Journal of Hypertension*.1993; 6:723-729.

Koh KK, Oh PC, Quon MJ. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovascular Research*.2009; 81: 649-659.

Kolluru GK, Siamwala JH, Chatterjee. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie*.2010; 30:1-13.

Kosnett MJ, Wedeen RP, Rothenberg SJ, Hipkins KL, Materna BL, Schwartz BS, Hu H, Woolf A. Recommendations for a medical management of adult lead exposure. *Environmental Health Perspectives*.2007; 115 (3) 463-471.

Lacolly P, Safar ME, Regnault V, Frohlich ED. Angiotensin II, mechanotransdução, and pulsatile arterial hemodynamics in hypertension. *American Journal Physiology Heart Circulatory Physiology*.2009; 297: 1567-1575.

Lanphear BP, Hornung R, Yolton K, Baghurst P, Bellinger DC. Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: an international pooled analysis. *Environmental Health Perspectives*.2005; 113: 894-899.

Lawton LJ, Donaldson WE. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biological Trace Element Research*. 1991; 28: 83-97.

Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Canais para K<sup>+</sup> ativados por Cálcio e a regulação do tônus vascular. *Physiology* 21: 69-79, 2006.

Lilis R, Gavriluscu N, Nestorrescu B, Dumitri C, Roventa A. Nephropathy in chronic lead poisoning. *British Journal Indian Medicine*. 1968; 25: 196-202.

Lincoln T, Dey N, Sellak H. Signal Transduction in smooth muscle. Invited review: cGMP-dependent protein Kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal Applied Physiology*. 2001; 91: 2001.

Luscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang Z. Endothelium- derived contracting factors. *Hypertension*. 1992; 19:117-130.

Lustberg M, Silbergeld E. Blood lead levels and mortality. *Archives Internal Medicine*. 2002;162: 2443-2449.

Lynes M, Kang J, Perdrizet G. Heavy metal ions in normal physiology, toxic stress and cytoprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences. Stress Responses in Biology and Medicine* 2007; 1113: 159-172.

Macmahon S, Peto R, Cutler J. Blood pressure, stroke and coronary heart disease: effects of prolonged differences in blood pressure-evidence from nine prospective observational studies corrected for dilution bias. *Lancet*. 1995; 335: 765-774.

Malvezzi CK, Moreira EG, Vassilieff VS, Vassilieff I, Cordellini S. Effect of L-arginine, dimercaptosuccinic acid (DMSA) and the association of L-arginine and DMSA on tissue lead mobilization and blood pressure level plumbism. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2001; 34: 1341-1346.

Mardini IA, FitzGerald GA. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: A growing class of anti-inflammatory drugs. *Molecular Interventions*.2001; 1(1): 30-8.

Marín J. Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *Journal of Autonomic Pharmacology*.1993; 13: 127-176.

Marques M, Millás I, Jiménez A, García-Colis E, Rodrigues-Feo J.A, Velasco S, Barrientos A, Casado S, López-Farré A. Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertersion in rats. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2001; 12: 2594-2600.

Massó EL, Corredor L, Antonio MT. Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and/ or cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.2007; 21: 210-216.

Mayer MG, Wilson DN. Health and safety- the downward trend in lead levels. *Journal of Power Sources*.1998; 73: 17-22.

McCabe TJ, Fulton D, Romans LJ, Sessa WC. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "Calcium dependent" eNOS activation by phosphorylation. *The journal of biological chemistry*.2000; 275 (9): 6123-6128.

McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: The role of superoxide anion. *Hypertension*.1999; 34: 539-545.

Melo AMC. Disfunção renal e exposição ambiental a chumbo e cádmio.1993. 39f. Dissertação de Mestrado em Saúde Comunitária - Programa de Pós Graduação em Saúde Comunitária. Salvador: Universidade Federal Bahia, 1993.

Menke A, Muntner P, Batuman V, Silbergeld EK, Guallar E. Blood lead below 0,48µmol/L (10µg/dL) and mortality among US adults. *Circulation*.2006; 114: 1388-1394.

Michel T, Gordon K L, Busconi L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide syntase. *Proceedings National Academy of Sciences of the United Stades of America*.1993; 90:6252-6256.

Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch*. 2010; 450(6): 807-16.

Miller FJ, Gutterman DD, Rios DC, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in arterosclerosis.*Circulation Research*.1998; 82:1289-1305.

Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thrombosis Research*.1977; 11: 323-44.

Moncada M, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*.1991; 43: 109-142.

Moreira FR, Moreira JC. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. *Ciência & Saúde Coletiva* 2004; 9: 167-181.

Moreira FR, Moreira JC. Effects of lead exposure on the human body and health implications, *Revista Panamericana del Salud Publica* 2004; 15: 119-129.

Muntner P, Vupputuri S, Coresh J, Batuman V. Blood lead and chronic kidney disease in the general United States population: results from NHANES III. *Kidney International*.1996; 63: 104-150.

Navas-Ancien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Lead exposure in cardiovascular disease –A systematic review. *Environmental Health Perspectives* 2007; 115: 472-482

Navas-Acien A, Schwartz BS, Rothenberg SJ, Hu H, Silbergeld EK, Guallar E. Bone lead levels and blood pressure endpoints A Meta-Analysis.*Epidemiology*.2008; 19(3): 496-504.

Neder AVF, Cotta TARG. Redução dos riscos de exposição ambiental e ocupacional ao chumbo. Projeto MMA/OPAS. Relatório da 1ª etapa do projeto. Brasília, maio de 1999.

Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American Physiological Society*.1995; 800-822.

NHANES III [National Health and Nutrition Examination Survey]. Hond ED, Nawrot T, Staessen JA. The relationship between blood pressure and blood lead in NHANES III. *Journal of Human Hypertension* 2002; 16: 563–568.

Ni Z, Hou S, Barton CH, Vaziri ND. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Kidney International*.2004; 66: 2329-2336.

Okada IA, Sakuma AM, Maio FD, Dovidauskas S, Zenebon O.Evaluation of lead and cadmium levels in milk in environmental contamination in the Vale do Paraíba Region, southeastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*.1997; 31:140-3.

Oliveira EM, Santos RA, Krieger JE. Standardization of a fluorimetric assay for the determination of tissue angiotensin-converting-activity in rats.*Brazilian Journal of Medical and biological research*.2000; 33(7): 755-64.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*.1987; 327: 524-6.

Paoliello MMB, Chasin AAM. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos.*Cadernos de Referência Ambiental* 2001; v.3. Salvador: CENTRO DE RECURSOS AMBIENTAIS-CREA.



Patrick L. Lead Toxicity, a review of the literature. Part I: Exposure, Evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review*.2006; 11 (1) 2-22.

Patrick L. Lead Toxicity.Part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review*.2006; 11 (2) 114-127.

Payton M, Hu H, Sparrow D, Weis ST. Low-level lead exposure and renal function in the Normative Aging Study. *American Journal of Epidemiology*.1994; 140: 821-829.

Perry Junior HM, Erlanger MW, Perry EF. Increase in the blood pressure of rats chronically fed low levels of lead. *Environmental Health Perspectives*.1988; 78:107-111.

Pimenta E, Oparil S.Prehypertension: epidemiology, consequences and treatment.*Nature Review Nephrology*.2010; 6(1):21-30.

Pollock CA, Ibels LS. Lead nephropathy--a preventable cause of renal failure. The *International Journal of Artificial Organs*.1988; 11(2):75-8.

Prentice RC, Kopp SJ. Cardiotoxicity of lead at various perfusate calcium concentrations: functional and metabolic responses of the perfused rat heart. *Toxicology Applied Pharmacology*.1985; 8:491-501.

Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel JB. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. The *American Journal of Physiology*.1998; 247:214-220.

Qin Z, Gongora MC, Ozumi K, Itoh S, Akram K, Ushio-Fukai M, Harrison DG, Fukai T. Role of menkes ATPase in angiotensin II-induced Hypertension: a Key modulator extracellular superoxide dismutase function. *Hypertension*. 2008; 52: 945-951.

Quitério SL, Silva CRS, Vaitsman DS, Martinhon PT, Moreira MFR, Araujo UC. Use of dust and air as indicators of environmental pollution in areas adjacent to a source of stationary lead emission. *Cadernos de Saúde Publica*.2001; 17:501-8.

Rabinowitz MB, Wetherill GW, Kopple JD. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *The Journal of Clinical Investigation* 1976; 58: 260-270.

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and oxide nitric. *British Journal of Pharmacology*.1987; 92: 639-646.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison D. Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *The journal of Clinical Investigation*.1996; 97(8): 1916-1923.

Rattmann YD, Mecanismos vasculares envolvidos nos efeitos vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK. 2009.145f. Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná.

Rogers JT, Patel M, Gilmour KM, Wood CM. Mechanisms behind Pb induced disruption of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American Journal Physiology.Regulatory Integrative Comparative Physiology*.2005; 289: 463-472.

Roncal C, Mu W, Reungjui S, Kim KM, Henderson GN, Ouyang X, Nakagawa T, Johnson RJ. Lead, at Low Levels, Accelerates Arteriopathy and Tubulointerstitial Injury in Chronic Kidney Disease. *American Journal Physiology Renal Physiology* 2007; 293: 1391-1396.

Roscoe RJ, Gittleman JL, Deddens J, Petersen MR, Halperin WE. Blood lead levels among children of lead exposure workers: a meta-analysis. *American Journal Industrial Medicine*.1999; 36: 475-481.

Rossoni LV, Salaices M, Miguel M, Briones AM, Barker LA, Vassallo DV, Alonso MJ. Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. *American Physiology.Heart Circulatory Physiology*.2002; 283: 2110-2118.

Roy A, Bellinger D, Hu H, Schwartz J, Ettinder AS, Wright RO, Bouchard M, Palaniappan K, Balakrishnan K. Lead exposure and behavior among young children in Chennai, India. *Environmental Health Perspectives*.2009; 117: 1607-1611.

Rothenberg SJ, Schnaas L, Perroni E, Hernandez RN, Martinez S. Hernandez C. Pre – and postnatal lead effect on head circumference: a case for a critical periods. *Neurotoxicol Teratol*. 1999B; 21: 1-11.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology*.1986; 250 (19): 815-821.

Sharifi AM, Darabi R, Akbarloo N, Larijani B, Khoshbaten A. Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced hypertension. *Toxicology Letters*.2004; 153: 233-238.

Shelkovnikov SA, Gonick HC. Influence of lead on rat thoracic aorta contraction and relaxation. *American Journal of Hypertension*.2001; 14: 873-878.

Silbergeld EK. Facilitative mechanics of lead as a carcinogen. *Mutat Research*. 2003; 533: 121-133.

Silvany-Neto AM, Carvalho FM, Chaves MEC, Brandão AM, Tavares TM. Repeated surveillance of lead poisoning among children.*Science of the Total Environment*.1989; 78: 178-186.

Silveira EA, Lizardo JHF, Souza LP, Stefanon I, Vassallo DV. Acute lead-induced vasoconstriction in vascular beds of isolated perfused rat tails in endothelium-dependent. *Brazilian Journal Medical Biological Research*. 2010; 43(5):492-499.

Skatchkov MP, Sperling D, Hink U, Mülsch A, Harrison DG, Sindermann I, Meinertz T, Münzel T. Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 1999; 254(2):319-24.

Skeegs LT. The existence of two forms of hyperensin. *The Journal of Experimental. Medicine*. 1954; 100: 363.

Skoczyska A, Renin-angiotensin-aldosterone system in chronic poisoning of rats with lead and cadmium. *Medycyna Pracy*. 1995; 46(3): 239-246.

Skoczyńska A, Juzwa W, Smolik R, Szechiński J, Běhal FJ. Response of the cardiovascular system to catecholamines in rats given small doses of lead. *Toxicology*. 1986; 39(3):275-89.

Snyder JE, Filipov NM, Parsons PJ, Lawrence DA. The efficiency of maternal transfer of lead and its influence on plasma IgE and splenic cellularity of mice. *Toxicology Sciaces*. 2000; 57:87-94.

Souza AM, Tavares CFF. Chumbo e anemia. *Medicina*. 2009; 42(3): 327-30.

Steckelings UM, Kaschima E, Unger T. The AT<sub>2</sub> receptor – A matter of love and hate. *Peptides*. 2005; 26: 1401-1409.

Stollery BT. Reaction time changes in workers exposed to lead. *Neurotoxicol Teratol*. 1996; 18: 477-483.

Stephan MC. Avaliação dos níveis de contaminação por metais pesados em amostras de sedimentos da região de Santos e Cubatão. 2007.66 f. Tese de Mestrado em Saúde Coletiva. Universidade Católica de Santos.

Stroes E, Hijmering M, Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters*.1998; 438: 161-164

Sun J, Lawrence J, Druhan J, Zweier L. Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.2010; 494: 130-137.

Sysalová JK. Determination of cadmium and lead levels in human blood of a general Czech population by GAAS. *Biological Trace Element Research*.1997; 56, 321-329.

Takaya T, Hirata K, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Inoue N, Yada T, Goto M, Fukatsu A, Hayashi T, Alp NJ, Channon MK, Yokoyama M, Kawashima S. A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression.*Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*.2007; 27: 1632-1637.

Taniyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*.2003; 42: 1075-1081.

Touzy RM, Schiffrin EL. Reactive Oxygen Species and Hypertension: A complex association. *Antioxidants & Redox Signaling*.2008; 10 (6): 1041-1044.

Touzy RM, Schiffrin EL. Reactive Oxygen Species in vascular biology: implications in hypertension.*Histochemistry and Cell Biology*.2004; 122: 339-352.

Touzy RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Reviews* .2000; 52: 639-672.

Triggle CR, Hollenberg M, Anderson TJ, Ding H, Jiang Y, Ceroni L, Wiehler WB, Ella SMN, Ellis A, Andrews K, McGuire JJ, Pannirselvam M. The endothelium in

health and disease – A Target for therapeutic intervention. *Journal of Smooth Muscle Research*.2003; 39(6): 249-267.

Tsalev DL, Zaprianov ZK. Lead. In Atomic absorption spectrometry in occupational and environment health practice. *CRC Press*.1985; 137-150.

Tsao DA, Yu HS, Cheng JT, Ho CK, Chang HR. The change of beta-adrenergic system in lead-induced hypertension. *Toxicological and Applied Pharmacological*.2000; 164(2):127-33.

Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin. Invest*. 100: 2793-2799; 1997

Valencia I, Castillo EF, Chamorro G, Bobadilla RA, Castillo C. Lead Induces Endothelium- and  $Ca^{2+}$ -Independent Contraction in Rat Aortic Rings. *Pharmacology & Toxicology*. 2001; 89: 177–182.

Vassallo DV, Moreira CM, Oliveira EM, Bertollo DM, Veloso TC. Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. *Toxicological and Applied Pharmacological*.1999; 156(2): 113-118.

Vassallo DV, Lebarb EC, Moreira CM, Wiggers GA, Stefanon I. Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008; 41: 862-879.

Vaziri ND, Ding Y, Ni Z, Gonick H. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension. *Kidney International*.1997; 52: 1042-1046.

Vaziri ND, Ding Y, Ni Z. Compensatory Up-regulation of nitric oxide synthase isoforms in lead-induced hypertension; Reversal by a superoxide dismutase-mimetic drug. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* .2001; 298: 679-685.

Vazir ND, Gonick HC. Cardiovascular effects of lead exposure. *The Indian Journal Medical Research*. 2008;128: 426-435.

Vaziri ND, Khan M. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 2007; 34(9):920-5.

Vaziri ND, Liang K, Ding Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney International*.1999; 56: 1492-1498.

Vaziri ND, Lin CY, Farmand F, Sindhu RK. Superóxido dismutase, catalase, glutathione, peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney International*.2003; 63: 186-194.

Victory W, Vander A J, Shulak JM, Schoeps P, Julius S. Lead, hypertension, and the rennin-angiotensin system in rats. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*.1982; 99(3): 354-362.

Vupputuri S, He J, Muntner P, Bazzano LA, Whelton PK, Batuman V. Blood Lead Level Is Associated With Elevated Blood Pressure in Blacks. *Hypertension*.2003; 41: 463-468.

Waalkes MP, Liu J, Goyer RA, Diwan BA. Metallothionein I/II double knock-out mice are hypertensive to lead-induced kidney carcinogenesis: role of inclusion body formation. *Cancer Research*.2004; 64: 7766-7772.

Waalkes MP, Diwan BA, Ward J, Devor DE, Goyer RA. Renal tubular tumors and atypical hyperplasias in b6c3f1 mice exposed to lead acetate during gestation and

lactation occur with minimal chronic nephropathy. *Cancer Research*.1995; 55: 5265-5271.

Wang L, Wu B, Sun Y, Xu T, Zhang X, Zhou M, Jiang W. Translocation of protein Kinase C isoforms is involved in propofol-induced endothelial nitric oxide synthase activation. *British Journal of Anesthesia*.2010; 104(5): 606-612.

Watts SW. Endothelin receptors: What's new and what do we need to know? *Am J Physiol Regul Comp Integr Comp Physiol*. 2010; 298: 254-260.

Webb RC, Winkquist RJ, Victory W, Vander AJ. In vivo and in vitro effects of lead on vascular reactivity in rats. *American Journal of Physiology*.1981; 241(2):H211-6.

Weuve J, Korrick SA, Weisskopf MG, Ryan LM, Schwartz J, Nie H, Grodstein F, Hu H. Cumulative exposure to lead in relation to cognitive function in older women. *Environ Health Perspect*. 2009;117(4):574-80.

Wright J.W.; Yamamoto B.J.; Harding, J.W. Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: New discoveries na clinical taretts. *Prog. Neurobiol*. 2008; 84: 157-181.

World Health Organization (WHO). IPCS. *Environmental Health criteria-85- Lead Environmental Aspects*. Geneva, 1989. 106p. Publish under the joint sponsorship the United Nations. Environmental Program, the International Labour Organization, and the world health organization.

World Health Organization (WHO). IPCS. *Environmental Health criteria-165- Inorganic Lead*. Geneva, 1995. 300p. Publish under the joint sponsorship the United Nations. Environmental Program, the International Labour Organization, and the world health organization.

Yamasaki T, Komuro I, Shiojima E, Yazaki Y.The renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. *Heart*.1996; 76: 33-35.



Yanagesawa M, Kurihara S, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. *Nature*.1988; 322: 411-415.

Yazbeck C, Thiebaugeorges O, Moureau T, Goua V, Debotte G, Sahuquillo J, Forhan A, Foliguet B, Magnin G, Slama R, Charles MA, Huel G. Maternal blood lead levels and the risk of pregnancy-induced hypertension: The EDEN cohort study. *Environmental Health Perspectives*.2009; 117: 1527-1530.

Zhang LF, Peng SQ, Sheng M, Li BL, Gang H, Sheng DY. Direct effects of lead ( $Pb^{+2}$ ) on the relaxation of in vitro cultured rat aorta to acetylcholine. *Toxicology Letters*.2007; 170: 104-110.

Zhang LF, Peng SQ, Wang S. Decreased aortic contractile reaction to 5-hydroxytryptamine in rats with long-term hypertension induced by lead ( $Pb^{+2}$ ) exposure. *Toxicology Letters*.2009; 186: 78-83.

**Anexo**

## Anexo I

PONE-D-10-05553

LOW-LEVEL LEAD EXPOSURE INCREASES SYSTOLIC ARTERIAL  
PRESSURE AND ENDOTHELIUM-DERIVED VASODILATOR FACTORS IN RAT  
AORTAS  
PLoS ONE

Dear Dr. Fiorim,

I am pleased to inform you that your manuscript has been deemed suitable for publication in PLoS ONE.

However, before your manuscript can be formally accepted, your files will be checked by the PLoS ONE production staff. Once they have completed these checks, they will return your manuscript to you so that you may attend to their requests and make any changes that you feel necessary.

To speed the publication of your paper you should look very closely at the PDF of your manuscript. You should consider this text to have the status of a production proof. Your paper will be tagged and laid out to produce professional PDF and online versions. However, the text you have supplied will be faithfully represented in your published manuscript exactly as you have supplied it.

OUR PRODUCTION SYSTEM DOES NOT INCLUDE AN AUTHOR PROOFING STEP AND SO THIS MAY BE YOUR LAST OPPORTUNITY TO CORRECT ANY ERRORS THAT ARE PRESENT IN YOUR MANUSCRIPT. THE CORRESPONDING AUTHOR IS RESPONSIBLE ON BEHALF OF ALL CO-AUTHORS FOR THE ACCURACY OF ALL CONTENT, INCLUDING SPELLING OF NAMES AND CURRENT AFFILIATIONS OF ALL THE AUTHORS, SO PLEASE ENSURE THESE HAVE BEEN CHECKED CAREFULLY.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Marcelo G. Bonini

Academic Editor

PLoS ONE

Reviewers' comments:

[NOTE: If reviewer comments were submitted as an attachment file, they will only be accessible via the submission site. Please log into your account, locate the manuscript record, and check for the action link "View Attachments". If this link does not appear, there are no attachment files to be viewed.]

Reviewer #1: While chronic lead exposure is known to induce hypertension and to alter endothelial function, treatment with low lead concentration has not been explored and thus built the focus of the present study. The study revealed that during the initial stages of nitric oxide synthase (iNOS) the increase in systolic blood pressure is mediated by an increase in the activity of ACE accompanied by an increase in p-eNOS, iNOS protein expression and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. The study is relevant since the blood lead content considered as relevant in the present study is below the reference value considered to be the upper limit of exposure in people exposed to lead in their occupation.

Although this work is outside of my work, the experiments are described in a clear way, and the results are easy to read. The conclusions drawn seem to make sense. With regard to the discussion and other work on lead exposure the present study seems to add valuable novel information to the field.

# LOW-LEVEL LEAD EXPOSURE INCREASES SYSTOLIC ARTERIAL PRESSURE AND ENDOTHELIUM-DERIVED VASODILATOR FACTORS IN RAT AORTAS

Jonaina Fiorim <sup>1</sup>, Rogério F. Ribeiro Júnior <sup>1</sup>, Edna A. Silveira <sup>1</sup>, Alessandra S. Padilha <sup>1</sup>, Marcos Vinícius A. Vescovi <sup>1</sup>, Honório C. de Jesus <sup>1</sup>, Ivanita Stefanon <sup>1</sup>, Mercedes Salaices <sup>3</sup> and Dalton V. Vassallo <sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Brazil.

<sup>2</sup> Health Science Center of Vitória- EMESCAM, Vitoria, ES, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Farmacología, Universidad Autónoma de Madrid, Spain.

Running Title: Lead increases blood pressure

e-mails:

[nanafiorim@hotmail.com](mailto:nanafiorim@hotmail.com)

[faustino43@oi.com.br](mailto:faustino43@oi.com.br)

[edna17@gmail.com](mailto:edna17@gmail.com)

[ale\\_spadilha@yahoo.com.br](mailto:ale_spadilha@yahoo.com.br)

[viniciusvescovi@hotmail.com](mailto:viniciusvescovi@hotmail.com)

[honerio2@cce.ufes.br](mailto:honerio2@cce.ufes.br)

[ivanita@pq.cnpq.br](mailto:ivanita@pq.cnpq.br)

[mercedes.salaices@uam.es](mailto:mercedes.salaices@uam.es)

[daltonv2@terra.com.br](mailto:daltonv2@terra.com.br)

Address Correspondence to:

Dalton V. Vassallo, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, CCS/UFES. Av. Marechal Campos, 1468. Maruípe.

29040-091, Vitoria, ES, Brasil. FAX: 55-27-2122 7330. E-mail: daltonv2@terra.com.br.

## Abstract

Chronic lead exposure induces hypertension and alters endothelial function. However, treatment with low lead concentrations was not explored yet. We analyzed the effects of 7 day exposure to low lead concentrations on endothelium-dependent responses. Wistar rats were treated with lead (1<sup>st</sup> dose 4 µg/100 g, subsequent dose 0.05 µg/100 g, i.m. to cover daily loss) or vehicle; blood levels attained at the end of treatment were 9.98 µg/dL. Lead treatment had the following effects: increase in systolic blood pressure (SBP); reduction on contractile response to phenylephrine (1 nM- 100 µM) of aortic rings; unaffected relaxation induced by acetylcholine (0.1 nM- 300 µM) or sodium nitroprusside (0.01 nM- 0.3 µM). Endothelium removal, *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (100 µM) and tetraethylammonium (2 mM) increased the response to phenylephrine in treated rats more than on untreated rats. Aminoguanidine (50 µM) increased but losartan (10 µM) and enalapril (10 µM) reduced the response to phenylephrine in treated rats. Lead treatment also increased aortic Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase functional activity, plasma angiotensin-converting enzyme (ACE) activity, protein expression of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha-1 subunit, phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS), and inducible nitric oxide synthase (iNOS). Our results suggest that on initial stages of lead exposure, increased SBP is caused by the increase in the activity ACE. This effect is accompanied by increased p-eNOS, iNOS protein expression and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase functional activity. These factors might be a compensatory mechanism to the increase in SBP.

**Keywords:** Lead, nitric oxide, renin-angiotensin system, potassium channels.

## 1 INTRODUCTION

Lead is considered an environmental pollutant of high risk to public health [1, 2]. This metal is extensively used by the industrial sector, thereby contributing to its wide environmental distribution. Usually, plasma lead levels in humans result from exposure to exogenous sources [3]. Occupational exposure occurs during the manufacture of ammunition, batteries, solder, ceramic glazes, plastics and sheet lead [4]. Lead affects the central nervous system [3] and the renal system [5], and population studies have demonstrated an association between lead exposure and kidney disease [6, 7]. Recently, more research has focused on the toxic effects of lead on the cardiovascular system and its association with hypertension in humans [8-10] and animals [11-13]. Several mechanisms have been proposed to cause lead-induced hypertension, such as alterations in calcium exchangeability [14], central sympathetic activity enhancement [15, 12], increases in plasma catecholamines [16], inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase [17], activation of direct smooth muscle protein kinase C [18], increased activity of the renin-angiotensin system [19] and endothelial dysfunction [20, 21].

Endothelial dysfunction is associated with hypertension and with a concomitant increase in morbidity and mortality [22, 23]. Vaziri et al. [21, 22] showed that treatment with 100 ppm of lead in drinking water for 12 weeks induces hypertension and endothelial dysfunction in Sprague-Dawley rats. Several reports have shown that the chronic lead treatment with 100 ppm in drinking water increases vascular reactivity to phenylephrine in aortic rings [24, 25, 13], although other authors have demonstrated a decrease in the vascular reactivity to phenylephrine after lead treatment [26]. It is still unclear whether this altered vascular reactivity can contribute to lead-induced hypertension.

The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) recommends that the concentration of lead in the blood is under 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$  in adults that experience occupational lead exposure [3, 27, 28]; nevertheless, individuals with blood lead concentrations between 31.4  $\mu\text{g}/\text{dL}$  and 53.5  $\mu\text{g}/\text{dL}$  showed an increase in arterial pressure [6, 9]. Recent experimental studies of lead toxicity demonstrated a concentrations of lead in the blood between 31.8  $\mu\text{g}/\text{dL}$  and 58.7  $\mu\text{g}/\text{dL}$  [29, 30, 13]; these concentrations are similar to those found in the

population of workers exposed to lead; however, little attention has been given to the effects of lead in the blood at concentrations below those found in humans with occupational lead exposure and the effects during the initial stages of lead exposure. Because of the lack of knowledge in these areas, we developed an experimental model of lead exposure in rats that produces blood concentrations below those found in humans with occupational lead exposure. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of seven-day treatment with a low concentration of lead acetate on the systolic blood pressure (SBP) and vascular reactivity in aortic rings.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### Animals and treatment

Male Wistar rats (260–300 g) were used for these studies. The care and use of laboratory animals were in accordance with the NIH guidelines, and all experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research as stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology and were approved by the Institutional Ethics Committee of the Health Science Center of Vitória (CEUA-EMESCAM 004/2007). All rats had free access to water and were fed rat chow *ad libitum*. Rats were divided into two groups: control (vehicle-saline, i.m.) or treated with lead acetate for seven days (1st dose: 4 µg/100 g, subsequent dose: 0.05 µg/100 g, i.m. to cover daily loss). At the end of the treatment, rats were anesthetized with pentobarbital (35 mg/kg, i.p.) and killed by exsanguination. Thoracic aortas were carefully dissected out and connective tissue was removed. For vascular reactivity experiments, the aortas were divided into cylindrical segments 4 mm in length. For analysis of protein expression, some arteries were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyzed. Blood samples were collected in tubes without EDTA and placed in ice and then centrifuged at 3,500 x g for 15 min at 4°C. The resulting plasma was stored at -80°C until use to determine ACE activity.



### **Blood pressure measurements**

Indirect systolic blood pressure was measured at the beginning and at the end of treatment using tail-cuff plethysmography (IITC Life Science, Inc). Conscious rats were restrained for 5–10 min in a warm and quiet room and conditioned to numerous cuff inflation-deflation cycles by a trained operator. Systolic blood pressure was measured, and the mean of three measurements was recorded [13].

### **Blood lead level measurements**

Blood lead level measurements were determined according to the protocol developed by Korecková-Sysalová [31]. Lead concentrations in samples of whole blood after 7 days of treatment were measured in duplicate by atomic fluorescence spectrometry (model: AAS5 EA with graphite furnace, Carl Zeiss, Germany) at the Centre for Exact Sciences - Chemistry Department (Federal University of Espírito Santo).

### **Vascular reactivity measurements**

Aortic segments (4 mm in length) were mounted between two parallel wires in 37°C organ baths containing Krebs-Henseleit solution (KHS, in mM: 124 NaCl, 4.6 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 EDTA, 23 NaHCO<sub>3</sub>) and gassed with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4). Arterial segments were stretched to an optimal resting tension of 1.0 g. Isometric tension was recorded using a force displacement transducer (TSD125C, CA, USA) connected to an acquisition system (MP100A, BIOPAC System, Inc., Santa Barbara, USA).

After a 45 min equilibration period, all aortic rings were initially exposed twice to 75 mM KCl. The first exposure checks their functional integrity, and the second exposure assesses the maximal tension developed. Afterwards, endothelial integrity was tested with acetylcholine (10 µM) in segments previously contracted with phenylephrine (1 µM). A relaxation equal to or greater than 90%

was considered demonstrative of the functional integrity of the endothelium. After a 45 min washout, concentration-response curves to phenylephrine were determined. Single curves were performed in each segment. Effects of the nonspecific NOS inhibitor *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100  $\mu$ M), the inducible NO synthase (iNOS) inhibitor aminoguanidine (50  $\mu$ M), the potassium ( $K^+$ ) channel blocker tetraethylammonium (TEA, 2 mM), the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (10  $\mu$ M), the AT<sub>1</sub> receptor blocker losartan (10  $\mu$ M) and the ACE inhibitor enalapril (10  $\mu$ M) were investigated. These drugs were added to the bath 30 min before performing the phenylephrine concentration-response curves.

The influence of the endothelium on the response to phenylephrine in untreated and treated- lead rats was investigated after its mechanical removal, which was performed by rubbing the lumen with a needle. The absence of endothelium was confirmed by the inability of 10  $\mu$ M acetylcholine (ACh) to produce relaxation.

In another set of experiments, after the 45 min equilibration period, aortic rings from untreated and lead-treated rats were pre-contracted with phenylephrine (1  $\mu$ M), and concentration-response curves to acetylcholine (0.1 nM - 300  $\mu$ M) or sodium nitroprusside (0.01 nM - 0.3  $\mu$ M) were determined.

The functional activity of the  $Na^+/K^+$ -ATPase in segments from control and lead-treated rats was measured using  $K^+$ -induced relaxation, as described by Webb and Bohr [32] and modified by Rossoni et al. [33]. After a 30-min equilibration period in normal Krebs, preparations were incubated for 30 min in  $K^+$ -free Krebs. The vessels were subsequently pre-contracted with phenylephrine, and once a plateau was attained, the concentration of KCl was increased step-wise (1, 2, 5 and 10 mM), with each step lasting for 2.5 min. After these procedures, preparations were incubated with 100  $\mu$ M ouabain for 30 min to inhibit sodium pump activity, and the  $K^+$ -induced relaxation curve was repeated.

### **Determination of angiotensin-converting enzyme (ACE) activity.**

The effect of lead treatment on serum angiotensin-converting enzyme (ACE) activity was determined according to the protocol detailed by Oliveira et al.

[34]. Briefly, serum (3  $\mu$ l) was incubated with 40  $\mu$ l of assay buffer containing 5 mM Hip-His-Leu in 0.4 M sodium borate buffer with 0.9 M NaCl, pH 8.3 for 15 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 190  $\mu$ l of 0.34 N NaOH. The product, His-Leu, was measured fluorometrically at an excitation wavelength 365-nm and an emission wavelength of 495-nm using a fluoro-colorimeter (Synergy 2, Biotek). Seventeen microliters of *o*-phthaldialdehyde (20 mg/ml) in methanol was added. To correct for the intrinsic fluorescence of the serum, time zero blanks ( $T_0$ ) were prepared by adding serum after NaOH. All assays were performed in triplicate.

### **Western blot analyses**

Proteins from homogenized arteries (50  $\mu$ g for eNOS, p-eNOS, iNOS, AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> receptors and 80  $\mu$ g for Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha-1 and 2 subunits) were separated by 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes that were incubated with mouse monoclonal antibodies for endothelial nitric oxide synthase (eNOS), phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS; 1:250; Transduction Laboratories, Lexington, UK), inducible nitric oxide synthase (iNOS; 1:250; Transduction Laboratories, Lexington, UK), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha-1 subunit (1:1000; Millipore, San Francisco, USA) or Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha-2 subunit (1:500; Millipore, San Francisco, USA) or rabbit polyclonal antibodies for AT<sub>1</sub> or AT<sub>2</sub> (1:500; Biotechnology, Santa Cruz, USA). After washing, membranes were incubated with anti-mouse (1:5000; StressGen, Victoria, Canada) or anti-rabbit (1:7000; StressGen, Victoria, Canada) antibodies conjugated to horseradish peroxidase. After thorough washing, immunocomplexes were detected using an enhanced horseradish peroxidase/chemiluminescence system (ECL Plus, Amersham International, Little Chalfont, UK) and film (Hyperfilm ECL International). Signals on the immunoblots were quantified with the National Institutes of Health Image V1.56 software. The same membranes were used to determine  $\alpha$ -actin expression using a mouse monoclonal antibody to  $\alpha$ -actin (1:5000; Sigma, USA).

## Statistical analyses

All values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Contractile responses were expressed as a percentage of the maximal response induced by 75 mM KCl. Relaxation responses to ACh or NPS were expressed as the percentage of relaxation of the maximal contractile response. For each concentration-response curve, the maximal effect ( $E_{\max}$ ) and the concentration of agonist that produced 50 % of the maximal response ( $\log EC_{50}$ ) were calculated using non-linear regression analysis (GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The sensitivities of the agonists were expressed as  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ). To compare the effects of endothelium denudation or L-NAME on the contractile responses to phenylephrine, some results were expressed as differences in the area under the concentration response curves (dAUC) for the control and experimental groups. These values indicate whether the magnitude of the effect of either endothelial denudation or L-NAME is different in untreated or lead-treated rats. Relaxation induced by  $K^+$  was expressed as a percentage of the tone previously obtained with phenylephrine. The curves of relaxation induced by  $K^+$  were constructed through the analysis of nonlinear regression of the concentration-response curves.

For protein expression, data were expressed as the ratio between signals on the immunoblot corresponding to the protein of interest and  $\alpha$ -actin. For protein expression of p-eNOS, data were expressed as the ratio between p-eNOS/eNOS. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of the number of rats indicated; differences were analyzed using Student's *t*-test or two-way ANOVA followed by a Bonferroni test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## Drugs and reagents

Lead acetate  $Pb(CH_3COO)_2$ , l-phenylephrine hydrochloride, L-NAME, enalapril, indomethacin, acetylcholine chloride, sodium pentobarbital, losartan, ouabain, sodium nitropusside, SOD, aminoguanidine and tetraethylammonium were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Salts and reagents used were of analytical grade from Sigma-Aldrich and Merck (Darmstadt, Germany).

## RESULTS

No differences in body weight between the two groups were observed before (untreated:  $261.1 \pm 1.39$  g,  $n = 40$ ; lead-treated:  $259 \pm 0.98$  g,  $n = 40$ ;  $P > 0.05$ ) or after treatment (untreated:  $305.5 \pm 2.88$  g,  $n = 40$ ; lead-treated:  $310.1 \pm 2.68$  g,  $n = 40$ ;  $P > 0.05$ ).

In rats exposed to seven-day lead treatment, the blood lead concentration attained was  $9.98 \mu\text{g/dL} \pm 1.70 \mu\text{g/dL}$  ( $n = 5$ ). A significant rise in systolic arterial blood pressure was observed seven days after lead exposure (untreated:  $121 \pm 1.50$  mmHg,  $n = 12$ ; lead treated:  $137 \pm 2.36$  mmHg,  $n = 12$ ,  $P < 0.05$ ).

### Effects of lead treatment on vascular reactivity.

Lead treatment did not affect the response to KCl (untreated:  $3.48 \pm 0.08$  g,  $n = 39$ ; lead-treated:  $3.52 \pm 0.09$  g,  $n = 40$ ;  $P > 0.05$ ), but it decreased the contractile responses induced by phenylephrine in rat aortas (Figure 1 A). It also decreased  $R_{\max}$  but not sensibility to phenylephrine (Table 1).

The concentration-dependent relaxation induced by ACh did not change in the treated group compared to the untreated group ( $R_{\max}$  untreated:  $98.90 \pm 0.97$ ,  $n = 8$ ;  $R_{\max}$  lead-treated:  $99.37 \pm 0.50$ ,  $n = 9$ ;  $pD_2$  untreated:  $7.13 \pm 0.32$ ,  $n = 8$ ;  $pD_2$  lead-treated:  $7.58 \pm 0.58$ ,  $n = 9$ ). Similarly, the response induced by NPS also did not change in both groups ( $R_{\max}$  untreated:  $100 \pm 0.24$ ,  $n = 8$ ;  $R_{\max}$  lead-treated:  $100 \pm 0.19$ ,  $n = 9$ ;  $pD_2$  untreated:  $7.63 \pm 0.33$ ,  $n = 8$ ;  $pD_2$  lead-treated:  $7.43 \pm 0.13$ ,  $n = 9$ ) (Figures 1 B and C).

### Effects of lead treatment on endothelial modulation of vasoconstrictor responses.

Both endothelium removal and incubation with the NOS inhibitor L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) shifted the concentration-response curves to the left after phenylephrine treatment in aortic segments from either group, and this shift was greater in

preparations from lead-treated than untreated rats, as shown by the dAUC values (Figures 2 A, B, C, D, E and F; Table 1). Lead treatment did not modify eNOS protein expression in the aorta, although it increased eNOS phosphorylation at Ser<sup>1177</sup> (Figure 2 G).

Aminoguanidine (50  $\mu$ M), a nonselective iNOS inhibitor, increased the vasoconstrictor response induced by phenylephrine in aortas from lead-treated rats, but it did not modify the responses to phenylephrine in aortas from control rats (Figures 3 A and B, Table 2). In addition, the protein expression of iNOS increased after lead treatment (Figure 3 C).

Nitric oxide can open K<sup>+</sup> channels [35] and contribute to a reduction in contractile responses induced by phenylephrine in aortas from lead-treated rats. TEA (2 mM), a K<sup>+</sup> channel blocker, potentiated the vasoconstrictor response induced by phenylephrine in aortic segments from either group, but these effects were greater in preparations from lead-treated than untreated rats, as shown by the dAUC values (Figures 3 D, E and F; Table 2).

The cyclooxygenase inhibitor, indomethacin (10  $\mu$ M), was used to investigate the putative role of prostanoids on the decreased response to phenylephrine in lead-treated rats. Indomethacin did not alter the R<sub>max</sub> and pD<sub>2</sub> values after phenylephrine treatment in aortic segments from both groups (Table 1).

### **Effects of lead treatment on renin-angiotensin system**

To investigate the involvement of the plasma renin-angiotensin system in potentiating the effects of lead exposure, angiotensin converting enzyme activity (ACE) was evaluated. Lead treatment increased plasma ACE activity (Figure 4 A). There was a significant correlation between systolic arterial blood pressure and ACE activity in the plasma of lead-treated rats ( $r=0.787$ ,  $P < 0.05$ ; Figure 4 B and C). These results reinforce the hypothesis that the renin-angiotensin system is involved in the rise in arterial blood pressure in lead-treated rats.

To investigate if the local renin-angiotensin system was involved in the alterations of vascular reactivity after phenylephrine treatment induced by lead, ACE and AT<sub>1</sub> receptors were blocked with enalapril (10  $\mu$ M) and losartan (10  $\mu$ M),

respectively. As shown in Figure 5 (A, B, C and D), both drugs reduced the vasoconstrictor response induced by phenylephrine in aortas from lead-treated rats but not in aortas from control rats (Table 2). This finding suggests that lead affects the local renin-angiotensin system; however, western blot analyses revealed similar levels of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> protein expression in the aortas from both groups (Figures 5 E and F).

### **Effects of lead treatment on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity**

We hypothesized that an increase in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity might be causing the reduction in vascular reactivity after phenylephrine treatment in the aortas from lead-treated rats. The activity of the sodium pump, which was evaluated by the potassium-induced relaxation curves before 100 μM ouabain incubation, increased in aortic rings from treated rats (Figure 6). Preincubation of intact segments with ouabain (100 μM) for 30 min in K<sup>+</sup>-free medium induced an increase in vascular tone in the aortas from both groups, but the increase was smaller in the last concentration of segments from lead-treated rats (Figure 6 A). In addition to this finding, the protein expression of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha-1 subunit increased after lead treatment (Figure 6 B). However, the protein expression of the alpha-2 subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase was similar in the aortas from untreated and lead-treated rats (Figure 6 C).

## **DISCUSSION**

The major findings from this study indicate that lead treatment used to attain a blood lead content of 9.98 μg/dL is sufficient to increase systolic arterial blood pressure and to decrease the contractile responses induced by phenylephrine in the rat aorta. This blood lead content is much lower than the reference value (60 μg/dL) considered to be the upper limit of exposure in people exposed to lead in their occupation [3, 27, 28]. We found that elevated systolic arterial blood pressure is caused by increased plasma ACE activity. The decrease in the contractile

responses after phenylephrine treatment in aortic rings from lead-treated rats is probably due to the increase in negative endothelial modulation. These responses might constitute a counterregulatory mechanism that acts to oppose the increase in blood pressure produced by lead.

The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) considers blood lead concentrations greater than or equal to 10  $\mu\text{g/dL}$  excessive for infants and children [36]. Blood lead concentrations greater than or equal to 30  $\mu\text{g/dL}$  are considered elevated in adults; however, the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) recommends limiting blood lead concentrations to 60  $\mu\text{g/dL}$  in adults whose jobs expose them to lead [3, 27, 28]. It has been reported that adults who experience occupational lead exposure have an increase in blood lead concentration (typically concentrations range from 30 to 60  $\mu\text{g/dL}$ ) [6, 37, 9]. In South Korea, individuals who experience occupational lead exposure have blood lead concentrations of approximately 31.4  $\mu\text{g/dL}$  [9]. That study indicated that lead exposure acts continuously on systolic blood pressure, and reductions in exposure may contribute to a decrease in blood pressure. Several studies have supported the association between high blood lead levels and hypertension [38, 8, 39]. In fact, previous reports have suggested that chronic lead exposure at low levels might contribute to hypertension. These studies showed the blood lead concentrations in treated rats were between 31.8  $\mu\text{g/dL}$  and 58.7  $\mu\text{g/dL}$  [29, 30, 13]. In the present study, we treated rats with a low dose of lead for seven days and attained a blood lead concentration of 9.98  $\mu\text{g/dL}$ . This concentration is lower than the levels observed in individuals with occupational lead exposure; nevertheless, this low concentration of lead increased systolic blood pressure in the treated rats.

Lead may induce hypertension via multiple mechanisms, but the pathogenesis is not entirely understood in the initial stages of exposure. Previous studies have shown that lead increased the synthesis and/or release of renin from the juxtaglomerular apparatus [15], the production of aldosterone [40] and the activity of plasma ACE [41, 11]. In our study, increased systolic arterial pressure was accompanied by elevation of plasma ACE activity in lead-treated rats; furthermore, there was a significant correlation between systolic arterial blood pressure and ACE activity in the plasma of lead-treated rats. Previous reports have shown that elevation in systolic blood pressure after 2 weeks of lead



treatment (100 ppm lead acetate in drinking water) was accompanied by an increase in plasma ACE activity [19]. These findings suggest that ACE activity might play a role in the initial stages of lead-induced hypertension.

Previous studies have shown that alterations in vascular tone are possibly involved in lead-induced hypertension [30, 42]; however, at low concentrations and in the initial stages of lead exposure, changes in vascular reactivity have not yet been described. Several reports have shown that chronic exposure to lead at low concentrations induces vasoconstriction in the aorta [24, 25, 13]. Chronic exposure to lead (100 ppm for 10 months) also decreased the contractile response induced by 5-HT in the aortas of lead-treated rats [26]. These effects might be mediated by increased production of reactive oxygen species [42], vasoconstrictor prostanoids of the cyclooxygenase pathway [13] and pathomorphological changes in the vessels [26].

In this study, we observed a reduction in the reactivity to phenylephrine in aortic rings after seven days of lead exposure. The reduction in vascular reactivity to phenylephrine was accompanied by a concomitant increase in the endothelial modulation of such responses. To investigate NO modulation, the NOS inhibitor, L-NAME, was used. We observed that L-NAME increased the reactivity to phenylephrine in both experimental groups; however, the magnitude of the effect of L-NAME was higher in lead-treated rats. These results suggest that lead increases NO bioavailability, thereby reducing reactivity to phenylephrine in the aortic rings. In support of these data, we also observed that a seven-day lead exposure increased eNOS phosphorylation at Ser<sup>1177</sup>. This specific residue is the major regulator of NO production [43, 44]. Other investigators have also indicated that high concentrations of lead increases the NO bioavailability in rat tail arteries [45]; however, Karimi et al.[24] showed that treatment with 100 ppm lead acetate for 28 days reduces NO bioavailability in rat aortas. This study was performed with chronic lead treatment, whereas our study was performed in the initial stages of lead exposure. The results concerning the effects of lead on NO production are controversial. Vaziri and Ding et al. [46] showed that incubation with 1 ppm lead acetate for 24 hours increases NO production in human coronary artery endothelial cells; however, other reports have shown that treatment with lead acetate (100 ppm in drinking water) for 12 weeks decreases [47, 20, 21, 48] urine

NO concentration. These contradictory results are probably due to differences in the timing and the form of lead treatment.

To investigate whether iNOS has a putative role mediating the effects of lead treatment, aminoguanidine, an iNOS blocker, was used. Aminoguanidine increased the effects of lead on the contractile response to phenylephrine. Similarly, we found that that lead exposure increased iNOS protein expression. These results suggest that NO from iNOS also mediates the reduced reactivity to phenylephrine induced by lead. Several reports have also suggested that chronic exposure to lead increases the expression of iNOS in the aorta [21, 48], heart [48] and kidney [29, 48]. Although we demonstrated an increase in NO bioavailability induced by lead, the relaxations induced by acetylcholine and sodium nitroprusside were not altered after seven days of lead exposure. These results indicate that after seven days, lead does not seem to modify the release of NO stimulated by acetylcholine or alter NO signaling pathways. In agreement with our findings, Grizzo et al. [13] showed that lead did not change the induced acetylcholine- and sodium nitroprusside-induced relaxations in lead-treated rats.

The increased NO could open  $K^+$  channels and contribute to increased negative modulation of the phenylephrine contraction. We demonstrated that TEA, a  $K^+$  channel blocker, potentiated the response to phenylephrine in aortic segments from either group, but these effects were greater in preparations from lead-treated than from untreated rats, as shown by dAUC values. These findings suggest that NO might be activating  $K^+$  channels in vascular smooth muscle cells, as previously reported [35, 49].

Prostacyclin is another endothelium-derived vasodilator that might be involved in negative endothelial modulation of aortic rings from lead-treated rats. It has been shown that lead exposure increases the activity of the cyclooxygenase pathways in aortic rings [24, 13] and in the tail vascular bed of rats [45]. In the present study, indomethacin did not modify vascular reactivity to phenylephrine in untreated and lead-treated rats. These findings suggest that the cyclooxygenase pathway, at least in these initial stages of exposure, is not involved in the decreased vascular reactivity in aortas from lead-treated rats.

Seven days of lead exposure increased arterial systolic pressure, even though vascular reactivity to phenylephrine decreased due to an increased NO bioavailability in aortic rings. A previous study showed that local angiotensin II

stimulates the production of NO in aortic endothelial cells [50]; therefore, we investigated whether the local renin-angiotensin system might be involved in the alterations of vascular reactivity to phenylephrine induced by lead. We showed that losartan and enalapril decreased the contractile response to phenylephrine in aortic rings from lead-treated rats, which is in agreement with the increased plasma ACE activity found in these rats. Despite the involvement of the local renin-angiotensin system in this experimental model, which could induce vasoconstriction, the vasodilatory effects of NO were more significant and contributed to a reduction in the vascular reactivity to phenylephrine. Western blot analyses showed similar levels of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> protein expression in the aortas from both groups. These findings suggest that seven days of lead treatment was not sufficient to produce alterations in the expression of these receptors, even under conditions of increased plasma ACE activity.

In this study, we showed that lead treatment induced the release of endothelium-derived factors such as nitric oxide and angiotensin II; however, both nitric oxide and angiotensin II stimulate Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, which might reduce vascular tone [51, 52, 53]. Therefore, we investigated the effects of lead treatment on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase functional activity, and we demonstrated that lead increases Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase functional activity. We analyzed this activity further by evaluating the expression of the alpha-1 and alpha-2 subunits of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Western blot analyses showed that the seven-day lead exposure increased the protein expression of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha-1 subunit; however, the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha-2 subunit was present in similar levels in aortas from untreated and lead-treated rats. Thus, the increased NO bioavailability and angiotensin II production induced by lead could be causing increased Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase functional activity.

In summary, seven day of lead treatment increased systolic arterial blood pressure and reduced vascular reactivity to phenylephrine in aortic segments from rats. The increased plasma ACE activity could contribute to elevated systolic blood pressure in lead-treated rats. In contrast, the decreased vascular reactivity due to increased NO bioavailability might constitute a counterregulatory mechanism against the elevated systolic arterial pressure observed in these animals, at least in the initial stages of lead exposure. Lead treatment also increased p-eNOS and iNOS protein expression. Presumably, the increased NO could open K<sup>+</sup> channels

and contribute to increased negative modulation of the phenylephrine contraction. In addition, both angiotensin II and NO bioavailability can stimulate  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase functional activity by decreasing vascular reactivity. In conclusion, our results show that vascular changes and increased systolic blood pressure occur in the initial stages of low-concentration lead exposure, and thus, lead can be considered an important risk factor for cardiovascular disease.

## **Grants**

This study was supported by grants from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico) /FAPES (Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo) /FUNCITEC (Fundação de Ciência e Tecnologia) (39767531/07), Brazil and from MCINN (SAF 2009- 07201) and ISCIII (Red RECAVA, RD06/0014/0011), Spain.

## REFERENCES

1. Menke A, Muntner P, Batuman V, Silbergeld EK, Guallar E (2006). Blood lead below 0,48 $\mu$ mol/L (10 $\mu$ g/dL) and mortality among US adults. *Circulation*.114: 1388-1394.
2. Vaziri ND, Gonick HC (2008).Cardiovascular effects of lead exposure. *Ind J Med Res*. 128: 426-435.
3. Patrick L (2006 a). Lead Toxicity, a review of the literature. Part I: Exposure, Evaluation, and treatment. *Altern Med Rev*.11 (1) 2-22.
4. Healey N (2009). Lead Toxicity, vulnerable subpopulations and emergency preparedness. *Radiat Prot Dosimetry*.134 (3-4): 143-151.
5. Roncal C, Mu W, Reungjui S, Kim KM, Henderson GN et al. (2007). Lead, at Low Levels, Accelerates Arteriopathy and Tubulointerstitial Injury in Chronic Kidney Disease. *Am J Physiol Renal Physiol*.293: 1391-1396.
6. Ehrlich R, Robins T, Jordaan E, Miller S, Mbuli S et al. (1998).Lead absorption and renal dysfunction in South African battery factory. *Occup Environ Med*. 55: 453-460.
7. Muntner P, He J, Vupputuri S, Coresh J, Batuman V (1996). Blood lead and chronic kidney disease in the general United States population: results from NHANES III. *Kidney Int*. 63: 104-150.
8. Glenn SB, Bandeen-Roche K, Lee BK, Weaver VM, Todd AC et al. (2006).Changes in systolic blood pressure associated with lead in blood and bone. *Epidemiology*.17: 538-544.

9. Glenn SB, Stewart WF, Links JM, Todd AC, Schwartz BS (2003).The longitudinal association of lead with blood pressure.Epidemiology.14 (1): 30-36.
  
10. Navas-Acien A, Schwartz BS, Rothenberg SJ, Hu H, Silbergeld EK et al. (2008). Bone lead levels and blood pressure endpoints: A Meta-Analysis. Epidemiology. 19(3): 496-504.
  
11. Carmignani M, Boscolo P, Poma A, Volpe AR (1999).Kininergic system and arterial hypertension following chronic exposure to inorganic lead. Immunopharmacology.44 (1-2):105-110.
  
12. Carmignani M, Volpe AR, Boscolo P, Qiao N, Gioacchino M et al. (2000).Catcholamine and oxide nitric systems as targets of chronic lead M exposure in inducing selective functional impairment. Life Sci.68: 401-451.
  
13. Grizzo LT, Cordellini S (2008). Perinatal Lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. Toxicol Sc.103 (1): 207-214.
  
14. Piccinini F, Favalli L, Chiari MC (1977). Experimental investigations on the concentration induced by lead in arterial smooth muscle.Toxicology.8(1): 43-51.
  
15. Boscolo P, Carmignani M (1988). Neurohumoral blood pressure regulation in lead exposure.Environ Health Perspect.78: 101-109.
  
16. Chang HR, Chen SS, Tsao DA, Cheng JT, Ho CK et al. (1997).Reduced vascular beta-adrenergic receptors and catecholamine response in rats with lead induced hypertension. Arch. Toxicol.71, 778-781.
  
17. Weiler E, Khalil-Manesh F, Gonick H (1988). Effects of lead and natriuretic hormone on kinetic of sodium potassium ATPase: possible relevance to hypertension. Environ Health Presp.113-115.

18. Watts SW, Chai S, Webb CR (1995).Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C. *Toxicology*. 99: 55-65.
19. Sharifi AM, Darabi R, Akbarloo N, Larijani B, Khoshbaten A (2004). Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced hypertension.*Toxicol Lett*.153: 233-238.
20. Vaziri ND, Liang K, Ding Y (1999 a).Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney Int*.56: 1492-1498.
21. Vaziri ND, Ding Y, Ni Z (1999 b). Nitric oxide synthase expression in the course of lead-induced hypertension.*Hypertension*.34: 558-562.
22. Triggle CR, Hollenberg M, Anderson TJ, Ding H, Jiang Y et al. (2003).The endothelium in health and disease - A target for therapeutic intervention. *J Smooth Muscle Res*.39 (6): 249-267.
23. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Félétou M (2009).Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Pysiol (Oxf)*.196(2):193-222.
24. Karimi G, Khoshbaten A, Abdollahi M, Sharifzadeh M, Namiranian K (2002). Effectes of subacute lead acetate administration on nitric oxide and cyclooxygenase pathways in rat isolated aortic ring. *Pharmacol Res*. 46 (1): 31-37.
25. Heydari A, Norouzzadeh A, Khoshbaten A, Asgari A, Ghasemi A et al. (2006).Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide methabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicol Lett*.166: 88-94.
26. Zhang LF, Peng SQ, Wang S (2009). Decreased aortic contractile reaction to 5-hydroxytryptamine in rats with long-term hypertension induced by lead (Pb<sup>+2</sup>) exposure. *Toxicol Lett*.186: 78-83.

27. Kosnett M J, Wedeen RP, Rothenberg SJ, Hipkins KL, Materna BL et al. (2007). Recommendations for medical management of adult lead exposure. *Environ Health Perspect.* 115(3):463-71.
28. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2005). Toxicological profile for lead. Atlanta, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
29. Gonick HC, Ding Y, Bondy SC, Ni Z, Vaziri ND (1997). Lead Induce Hypertension. Interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. *Hypertension.* 30 (6) 1487-1492.
30. Marques M, Millás I, Jiménez A, García-Colis E, Rodrigues-Feo JA et al. (2001). Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertension in rats. *J Am Soc Nephrol.* 12: 2594-2600.
31. Koresková-Sysalová J (1997). Determination of cadmium and lead levels in human blood of a general Czech population by GAAS. *Biological Trace Element Research.* 56, 321-329.
32. Weeb RC, Bohr DF (1978). Potassium induced relaxation as an indicator of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase activity in vascular smooth muscle. *Blood Vessels.* 15:198-207.
33. Rossoni LV, Salaices M, Marín J, Vassallo DV, Alonso MJ (2002). Alterations in phenylephrine induced contractions and the vascular expression of  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase in ouabain- induced hypertension. *Br J Pharmacol.* 135(3): 771-81.
34. Oliveira EM, Santos RA, Krieger JE (2000). Standartization of a fluorimetric assay for the determination of tissue angiotensin-converting-activity in rats. *Braz J Med Res.* 33(7): 755-64.
35. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA (1994). Nitric Oxide directly activates calcium-dependent potassium channel in vascular smooth muscle. *Nature.* 368 (6474): 850-853.



36. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2005). Blood lead levels-United States, 1999-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly. Rep.* 54:513-516.
37. Bener A, Obineche E, Gillett M, Pasha MA, Bishawi B (2001). Association between blood levels of lead, blood pressure, and risk of diabetes and heart disease in workers. *Int Arch Occup Environ Health.* 74: 375-378.
38. Harlan WR (1988). The relationship of blood lead levels to blood pressure in the U.S. population. *Environ Health Perspect.* 78:9-13.
39. Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ (2007). Lead exposure in cardiovascular disease –A systematic review. *Environ Health Perspect.* 115: 472-482.
40. Goodfriend TL, Ball DL, Elliott ME (1995). Lead increase aldosterone production by rat adrenal cells. *Hypertension.* 25: 785-789.
41. Campbell BC, Meredith PA, Scott JJ (1985). Lead exposure and changes in the renin-angiotensin-aldosterone system in man. *Toxicol Lett.* 25: 25-32.
42. Courtois E, Marques M, Barrientos A, Casado S, López-Farré A (2003). Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *J Am Soc Nephrol.* 14: 1464-1470.
43. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R et al. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 399: 601-605.
44. McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC (2000). Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain “Calcium dependent” eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 275 (9): 6123-6128.

45. Silveira EA, Lizardo JHF, Souza LP, Stefanon I, Vassallo DV (2010). Acute lead-induced vasoconstriction in vascular beds of isolated perfused rat tails in endothelium-dependent. *Braz J Med Biol Res.* 43(5): 492-499.
46. Vaziri ND, Ding Y (2001). Effects of lead on nitric oxide synthase expression on coronary endothelial cells: a role of superoxide. *Hypertension.* 37(2): 223-6.
47. Vaziri ND, Ding Y, Ni Z, Gonick H (1997). Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension. *Kidney Int.* 52: 1042-1046.
48. Vaziri ND, Ding Y, Ni Z (2001). Compensatory Up-regulation of nitric oxide synthase isoforms in lead-induced hypertension; Reversal by a superoxide dismutase-mimetic drug. *J Pharmacol Exp Ther.* 298: 679-685.
49. Féletou M (2009). Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: Therapeutic options? *Br J Pharmacol.* 156: 545-562.
50. Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel JB (1998). Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am J Physiol.* 274: H214-H220.
51. Brock TA, Lewis LJ, Smith JB (1982). Angiotensin increases  $\text{Na}^+$  entry and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump activity in cultures of smooth muscle from rat aorta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79(5): 1438-1442.
52. Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman, NB (1994b). Stimulation of vascular  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am J Physiol.* 266(35): H2146-H2151.
53. Isenovic ER, Jacobs DB, Kedees MH, Sha Q, Milivojevic N et al. (2003). Angiotensin II regulation of  $\text{Na}^+$  pump involves the phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 145: 1151-1160.

## Legends

**Figure 1.** The effects of seven-day exposure to lead acetate on the concentration-response curves to phenylephrine (A), acetylcholine (B) and sodium nitroprusside (NSP; C) treatment in aortic rings. \*P < 0.05 by Student's *t*-test. Number of animals used is indicated in parentheses.

**Figure 2.** The effects of endothelium removal (E<sup>-</sup>) (A, B) and *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μM) (D, E) on the concentration-response curve for phenylephrine treatment in aortic rings from untreated (CT) and lead-treated rats (Pb<sup>+2</sup>). The inset shows differences in area under the concentration-response curves (dAUC) in endothelium-denuded and intact segments (C) and in the presence and absence of L-NAME (F). Densitometry analyses of western blots for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS) protein expression in aortas from untreated (CT) and lead-treated rats (Pb<sup>+2</sup>) (G). Representative blots are also shown. \*P < 0.05 by Student's *t*-test. Number of animals used is indicated in parentheses.

**Figure 3.** The effects of aminoguanidine (50 μM) (A, B) and TEA (2 mM) (D, E) on the concentration-response curves to phenylephrine in endothelium-intact aortic segments from untreated (CT) and lead-treated rats (Pb<sup>+2</sup>). The inset shows differences in dAUC in the presence and absence of TEA (F). Densitometry analyses of western blots for inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein expression in aortas from untreated (CT) and lead-treated rats (Pb<sup>+2</sup>) (C). Representative blots are shown. \*P < 0.05 by Student's *t*-test. Number of animals used is indicated in parentheses.

**Figure 4.** Angiotensin converting enzyme (ACE) activity (A)(nmol His-Leu/min) in plasma; correlation between systolic arterial blood pressure and ACE activity (nmol His-Leu/min) in plasma of control and lead-treated rats (B) (*r* = 0.787, *P* < 0.05). \*P < 0.05 by Student's *t*-test. Number of animals used is indicated in parentheses.

**Figure 5.** Effect of losartan (10  $\mu$ M) (A, B) and enalapril (10  $\mu$ M) (C, D) on the concentration-response curves to phenylephrine in endothelium-intact aortic segments from untreated (CT) and lead-treated rats ( $Pb^{+2}$ ). Densitometry analyses of the western blots for receptors  $AT_1$  (E) and  $AT_2$  (F) in aortas from untreated (CT) and lead-treated rats ( $Pb^{+2}$ ). Representative blots are also shown.\* $P < 0.05$  by Student's *t*-test. Number of animals used is indicated in parentheses.

**Figure 6.** Potassium-induced relaxation in aortic rings from untreated (CT) and lead-treated ( $Pb^{+2}$ ) rats previously incubated in a  $K^+$ -free medium and contracted with phenylephrine before and after incubation with 100  $\mu$ M ouabain (A). Densitometry analyses of the western blots for the alpha-1 subunit (B) and alpha-2 subunit (C) in aortas from untreated (CT) and lead-treated rats ( $Pb^{+2}$ ). Representative blots are also shown. \* $P < 0.05$  (CT vs.  $Pb^{+2}$ ) by Student's *t*-test or two-way ANOVA followed by a Bonferroni test. # $P < 0.05$  (CT OUA vs.  $Pb^{+2}$  OUA) by two-way ANOVA followed by a Bonferroni test. Number of animals used is indicated in parentheses.

**Table 1**

Parameters of maximal response ( $R_{\max}$ ) and sensitivity ( $pD_2$ ) of the concentration-response curves to phenylephrine in the aortas from untreated and lead-treated rats, before (E+) and after (E-) endothelial damage and after  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100  $\mu$ M) and indomethacin (10  $\mu$ M) incubation.

	Untreated		Lead treated	
	Rmax	pD2	Rmax	pD2
<b>Control</b>	81.80 $\pm$ 4,46	6.55 $\pm$ 0,1	66.15 $\pm$ 4,66 <sup>#</sup>	6.29 $\pm$ 0,06
<b>E<sup>-</sup></b>	150.4 $\pm$ 7,32 <sup>#</sup>	7.65 $\pm$ 0.14 <sup>#</sup>	152.1 $\pm$ 10,43 <sup>*</sup>	7.37 $\pm$ 0.10 <sup>*</sup>
<b>L-NAME</b>	130.1 $\pm$ 2,57 <sup>#</sup>	7.69 $\pm$ 0.23 <sup>#</sup>	148.9 $\pm$ 3.22 <sup>*</sup>	7.12 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>
<b>Indomethacin</b>	85.64 $\pm$ 8.71	6.64 $\pm$ 0,08	64.61 $\pm$ 5.67	6.39 $\pm$ 0.07

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of the number of animals shown in Fig. 2;  $R_{\max}$ , maximal effect (expressed as a percentage of the maximal response induced by 75 mM KCl);  $pD_2$ , -log one-half  $R_{\max}$ ; Control; E<sup>-</sup>, endothelium removal; L-NAME,  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester; indomethacin. P < 0.05 vs. untreated control rats (<sup>#</sup>) and lead-treated control rats (<sup>\*</sup>).

**Table 2**

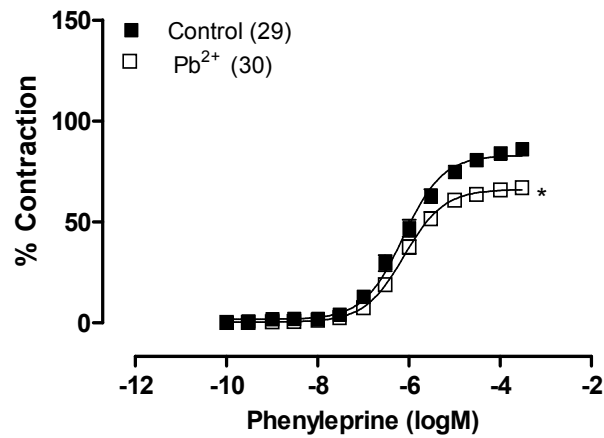
Effects of aminoguanidine, TEA, losartan and enalapril on the vascular responses to phenylephrine ( $R_{\max}$  and  $pD_2$ ) in aortas from untreated and lead-treated rats.

	Untreated		Lead treated		
	$R_{\max}$	$pD_2$	$R_{\max}$		$pD_2$
<b>Control</b>	82.06 ± 6,48	6.02 ± 0,15	60.35 ± 5,99 <sup>#</sup>	±	6.14 ± 0.08
<b>Aminoguanidine</b>	86.93 ± 5.56	6.36 ± 0,19	83.71 ± 2,57*	±	6.23 ± 0.08
<b>TEA</b>	100.04 ± 3.70 <sup>#</sup>	6.50 ± 0,11 <sup>#</sup>	98.29 ± 5,30*	±	6.30 ± 0,08
<b>Enalapril</b>	79.12 ± 2.69	6.21 ± 0.13	48.93 ± 2.53*	±	6.20 ± 0.13
<b>Losartan</b>	79.77 ± 4.12	6.19 ± 0.05	35.13 ± 5.89*	±	5.98 ± 0.12

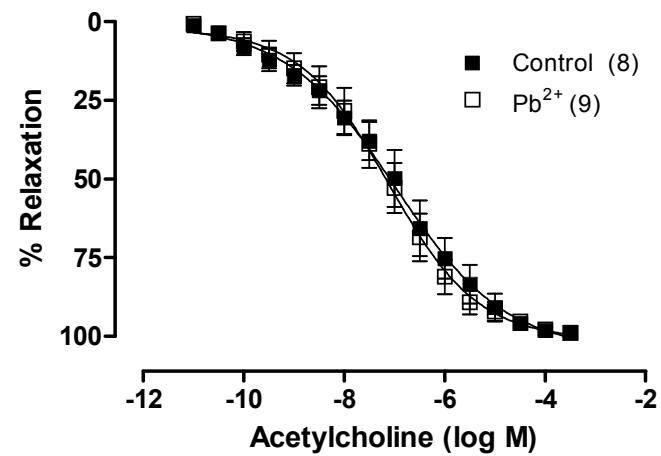
Results are expressed as mean ± SEM of the number of animals shown in Figs. 3 and 5;  $R_{\max}$ , maximal effect (expressed as a percentage of the maximal response induced by 75 mM KCl);  $pD_2$ , -log one-half  $R_{\max}$ ; AG, aminoguanidine; TEA, tetraethylammonium; losartan; enalapril.  $P < 0.05$  vs. untreated control rats (<sup>#</sup>) and lead-treated control rats (\*).

Figure 1

A



B



C

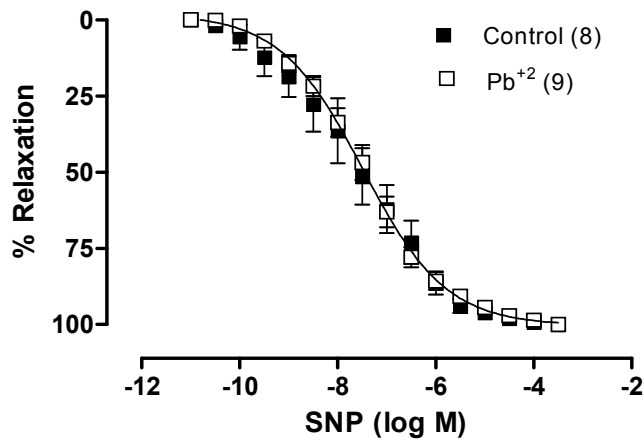
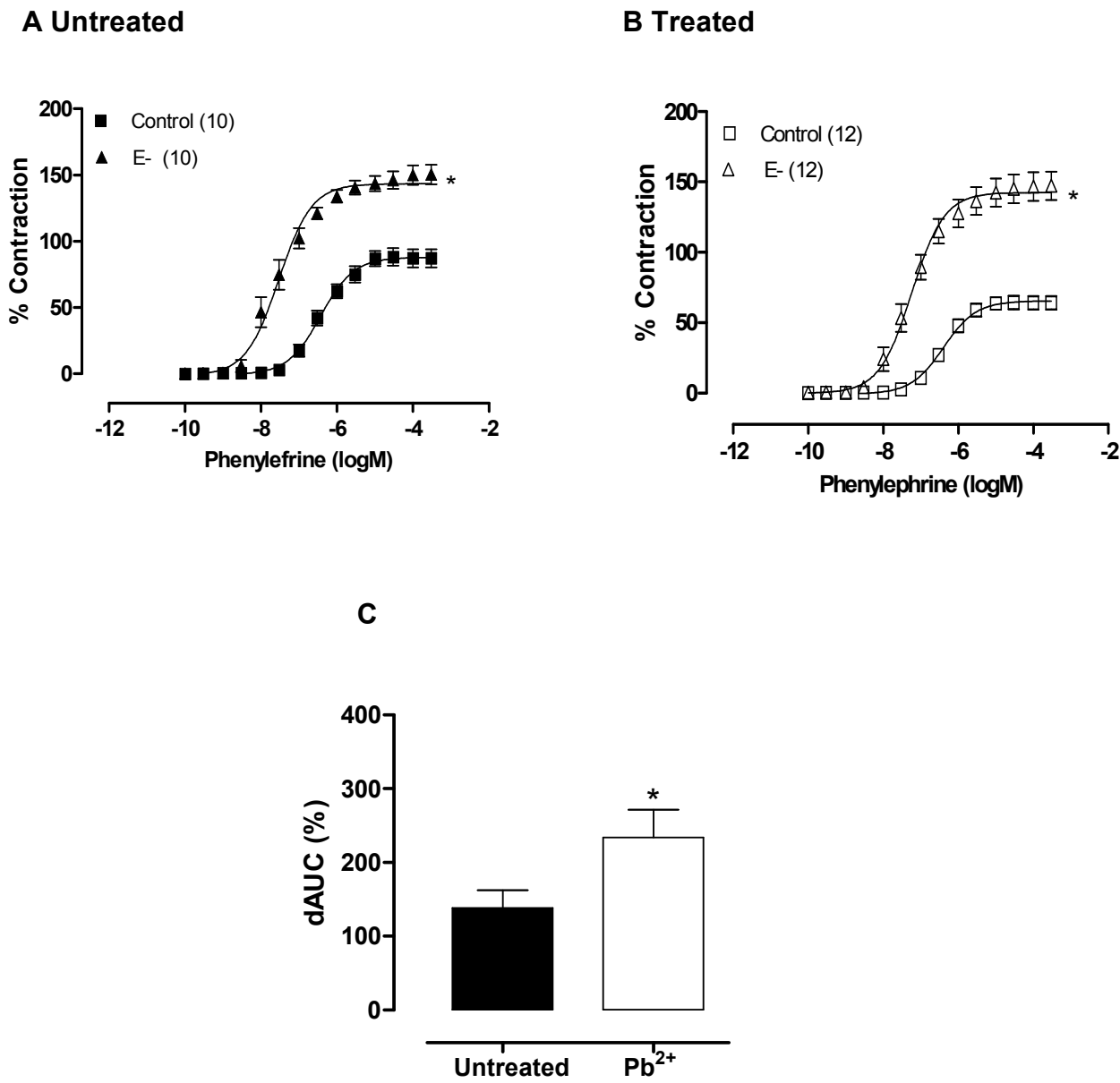


Figure 2





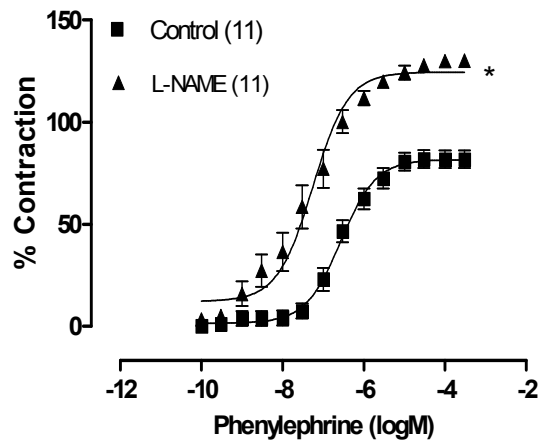
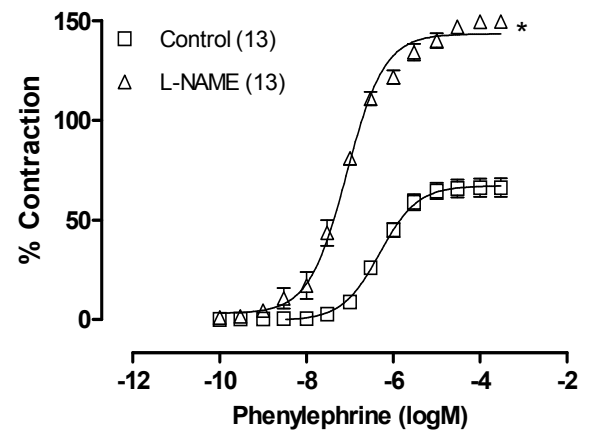
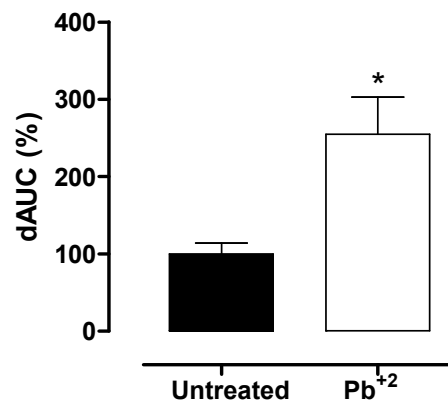
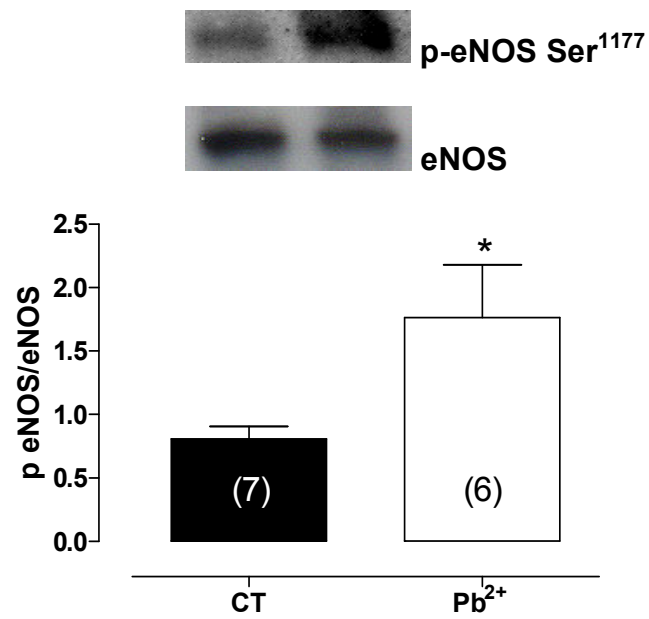
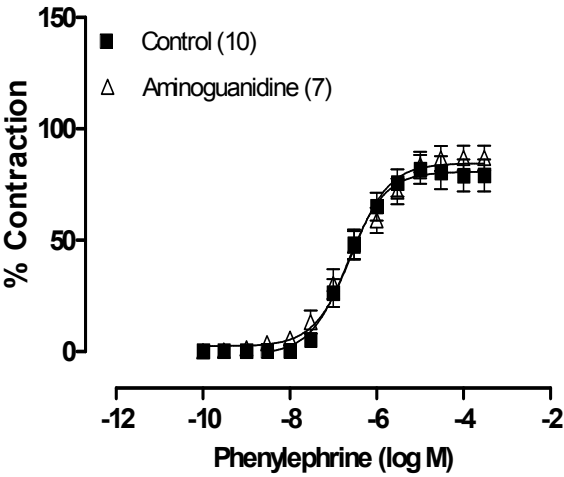
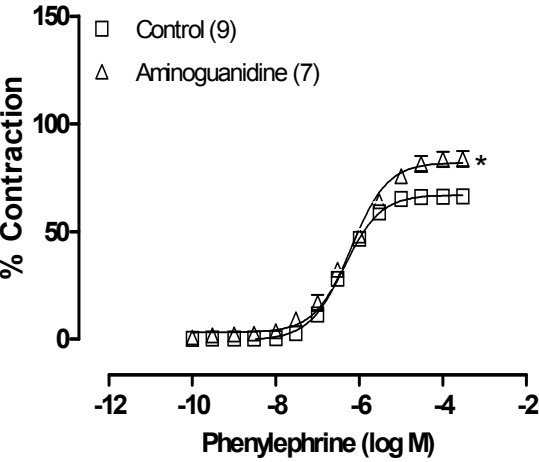
**D****E****F****G**

Figure 3

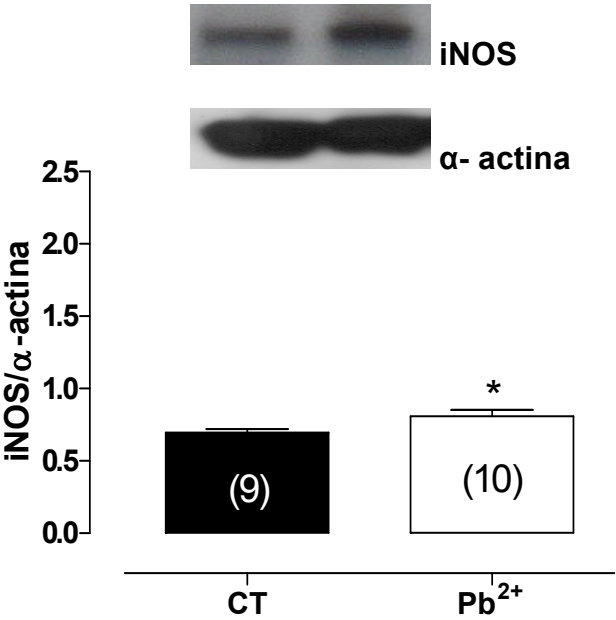
A Untreated



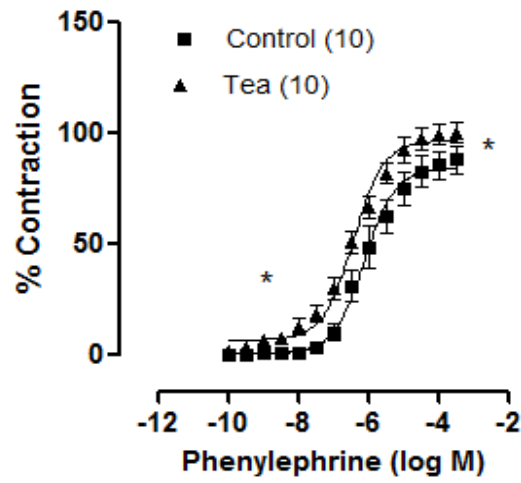
B Treated



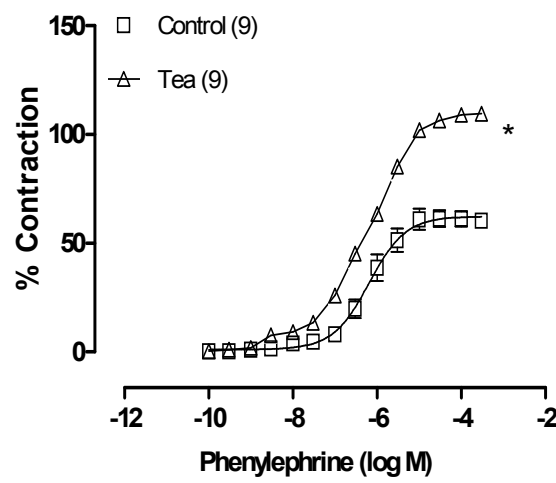
C



D Untreated



E Treated



F

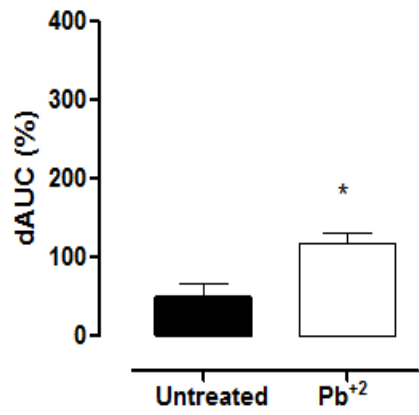
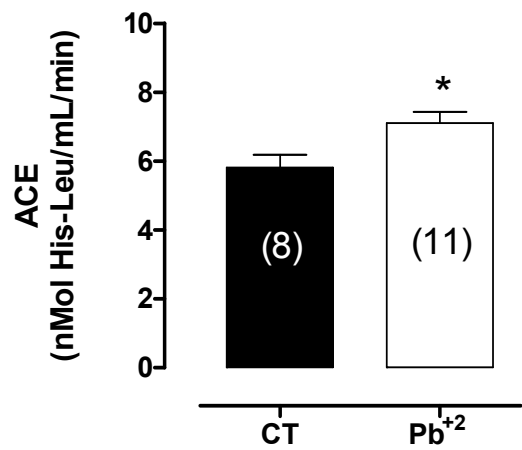


Figure 4

A



B

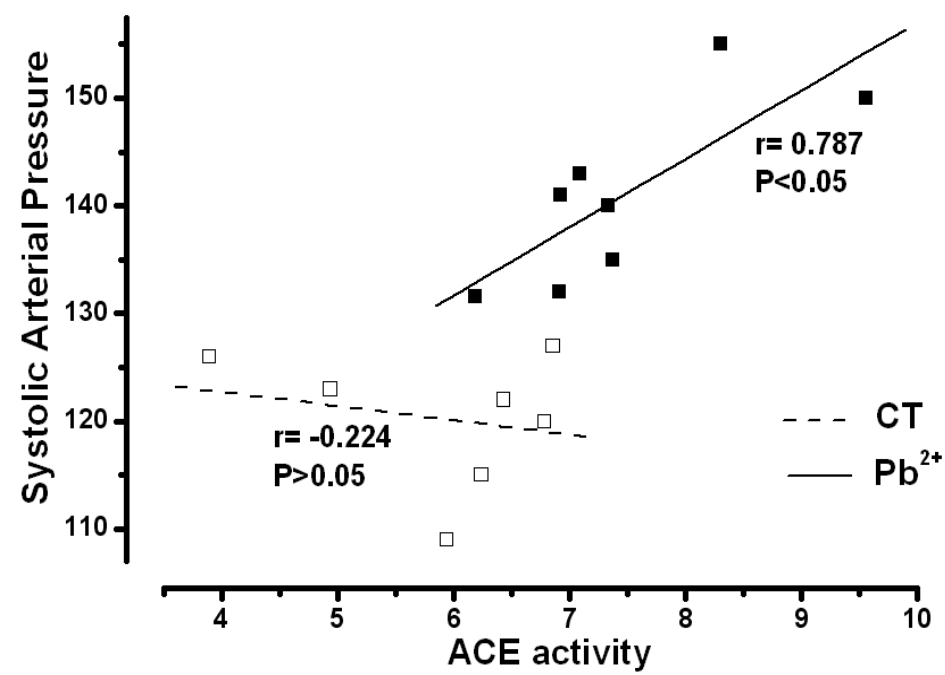
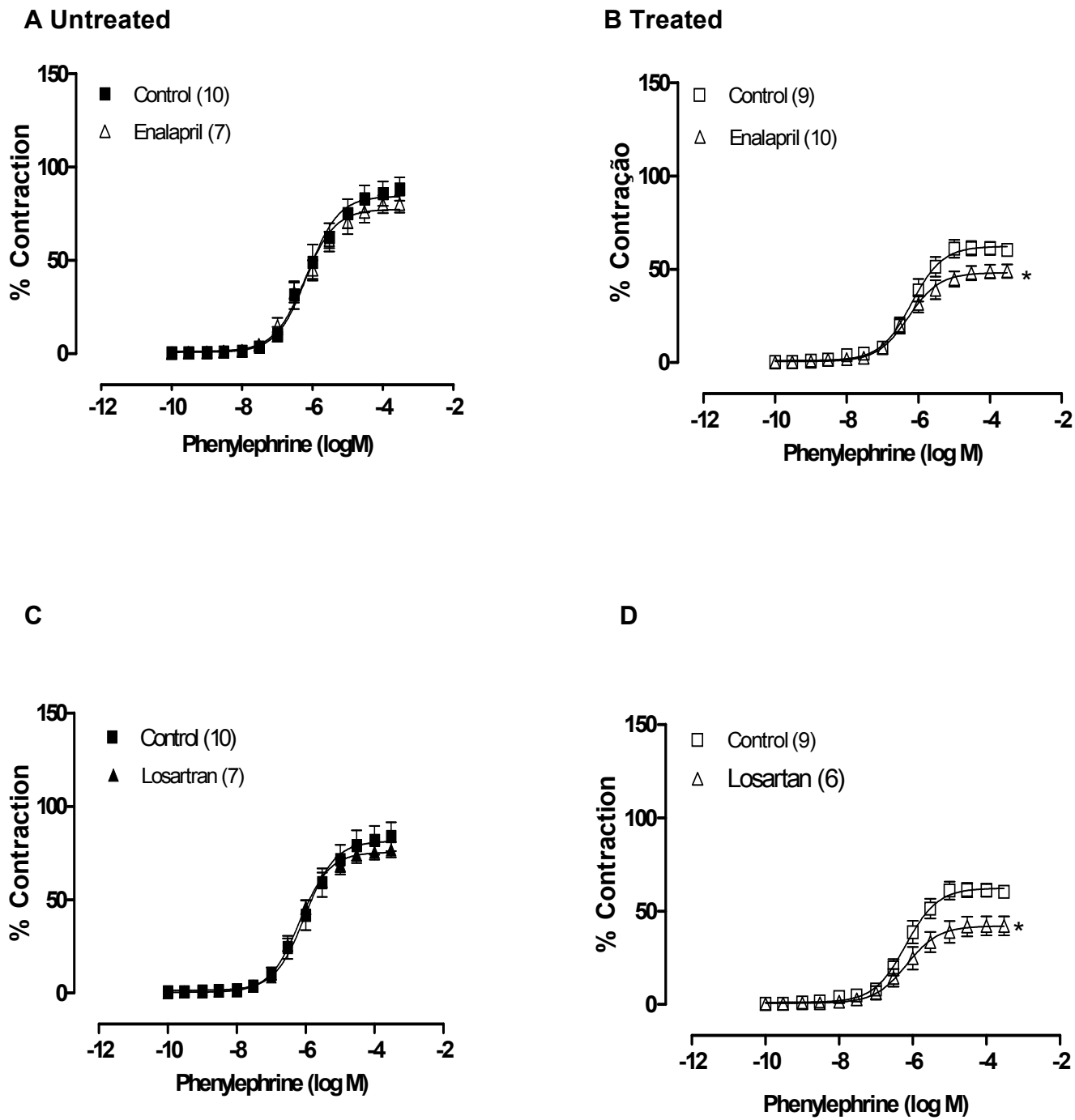
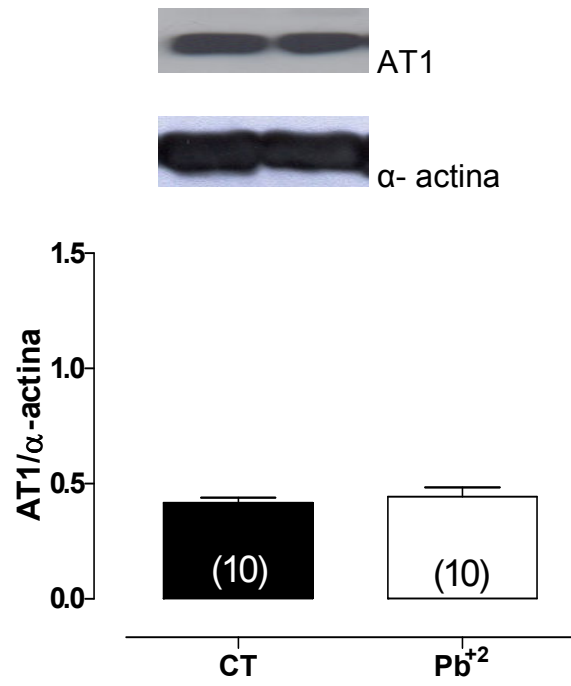


Figure 5



E



F

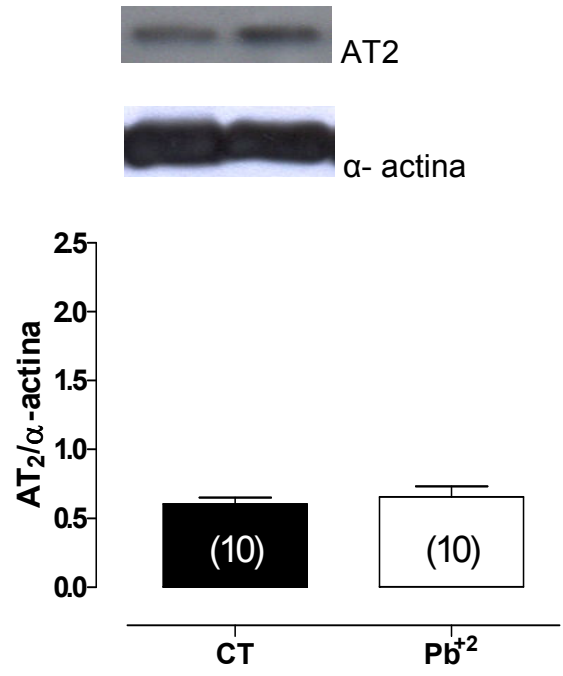
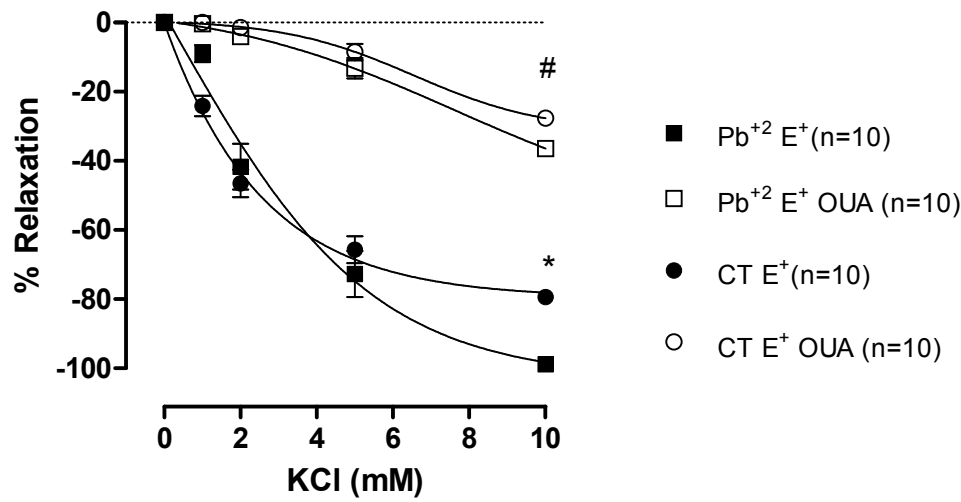
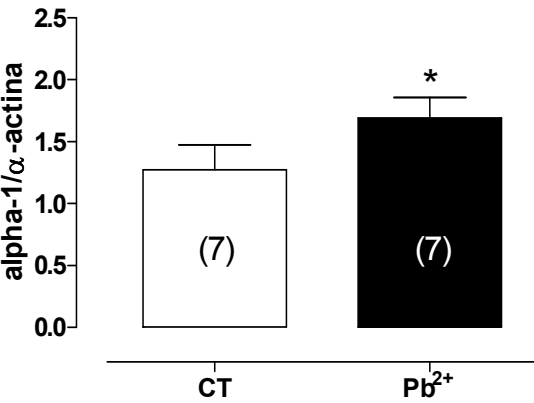
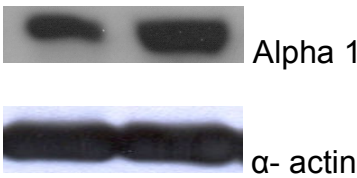


Figure 7

A



B



C

